

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Patología Animal II



CONGELACIÓN DE SEMEN DE LA ESPECIE OVINA :
CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LAS DOSIS
DESCONGELADAS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Julián Garde López-Brea

Bajo la dirección de la doctora

Isabel Vázquez González

Madrid, 2002

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

**CONGELACION DE SEMEN EN LA ESPECIE OVINA: CARACTERISTICAS
BIOLOGICAS DE LAS DOSIS DESCONGELADAS.**

Memoria presentada por el Licenciado
Julián Garde López-Brea para optar al
grado de Doctor en Veterinaria

Isabel Vázquez González, Coordinadora del Area de Reproducción del
Departamento de Producción Animal del CIT-INIA de Madrid

INFORMA

Que la Tesis Doctoral titulada **CONGELACION DE SEMEN EN LA ESPECIE OVINA: CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE LAS DOSIS DESCONGELADAS**, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. **Julián GARDE LOPEZ-BREA**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que cumple las condiciones exigidas para ser presentada a efectos de ser juzgada.

Madrid a 14 de Diciembre de 1992.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Isabel Vázquez', with a long, sweeping horizontal stroke extending to the right.

Isabel Vázquez González.

SUMARIO

INDICE

<u>1. INTRODUCCION</u>	1
1.1. Objetivos	3
<u>2. REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	4
2.1. Machos Reproductores y recogida de semen . . .	4
2.1.1. Manejo de reproductores	4
2.1.2. Recogida de semen	5
2.1.2.1. Vagina artificial	5
2.1.2.2. Otros sistemas de recogida . . .	6
2.2. Contrastación seminal	7
2.2.1. Pruebas de motilidad	8
2.2.1.1. Motilidad masal	8
2.2.1.2. Motilidad individual	8
2.2.2. Morfoanomalías	9
2.2.3. Integridad acrosómica	9
2.2.4. Test de endósmosis celular	10
2.2.5. Tinciones vitales	11
2.2.6. Fecundación "in vitro"	11
2.2.7. Pruebas bioquímicas	12
2.3. Congelación del semen	13
2.3.1. Diluyentes empleados en la congelación del semen	14
2.3.2. Tratamiento del semen para su congelación	17
2.3.2.1. Dilución	17
2.3.2.2. Refrigeración y equilibración	18
2.3.2.3. Velocidad de congelación	19
2.3.2.4. Envases para la congelación	20
2.3.3. Consecuencias de los procesos de congelación sobre la célula espermática .	21

	<i>Páginas</i>
2.3.3.1. Efectos debidos al "choque frío" . . .	21
2.3.3.2. Efectos causados por la congelación	23
2.3.3.3. Consecuencias biológicas de los procesos de congelación sobre el espermatozoide	24
2.4. Capacitación espermática y reacción acrosómica	26
2.4.1. Capacitación y reaccion acrosómica "in vivo"	26
2.4.1.1. Transporte espermático	27
2.4.1.2. Capacitación y reacción acrosómica . .	29
2.4.2. Capacitación y reacción acrosómica "in vitro"	31
2.4.3. Técnicas laborales de valoración de capacitación y reacción acrosómica	34
2.5. Fertilidad con semen congelado	36
2.5.1. Calidad inicial del semen	36
2.5.2. Tratamiento del semen	37
2.5.3. Lugar de deposición del semen	37
2.5.4. Concentración espermática	39
2.5.5. Sincronización de celos	40
2.5.6. Momento de la inseminación	41
<u>3. MATERIAL Y METODO</u>	42
3.1. Material	42
3.1.1. Material biológico	42
3.1.1.1. Machos reproductores	42
3.1.1.2. Hembras inseminadas	42
3.1.1.3. Hámsters	43
3.1.2. Material empleado en la recogida y congelación del semen	43
3.1.3. Material general de laboratorio	44

3.1.4. Material de laboratorio específico para el sistema de FIV	44
3.1.5. Material para la obtención de ovocitos de hámster	45
3.1.6. Material para la I.A.	45
3.1.7. Reactivos empleados para la conservación del semen	46
3.1.8. Reactivos para el sistema de FIV	46
3.1.9. Reactivos utilizados en la TST	47
3.1.10. Otros Reactivos	47
3.2. Método	48
3.2.1. Diseño experimental	48
3.2.1.1. Experiencia 1: Análisis del efecto ejercido por los procesos de congelación sobre la función espermática "in vitro".	48
3.2.1.2. Experiencia 2: Incidencia del factor individual sobre la R.A. "in vitro" en el semen congelado de morueco. Efectos sobre fertilidad.	49
3.2.1.3. Experiencia 3: Correlaciones entre analítica de laboratorio y pruebas de fertilidad	50
3.2.2. Metodología	50
3.2.2.1. Obtención y contrastación inicial del semen	50
3.2.2.2. Conservación del semen	51
3.2.2.3. Capacitación y R.A. "in vitro"	63
3.2.2.4. Inseminación artificial con semen congelado y testado	66
3.2.3. Análisis estadístico	68
<u>4. RESULTADOS</u>	72
4.1. Análisis del efecto ejercido por los procesos de congelación sobre la función espermática "in vitro"	72

4.2. Incidencia del factor individual sobre la reacción acrosómica "in vitro" en el semen de morueco congelado. Efectos sobre fertilidad	88
4.3. Correlaciones entre analítica de laboratorio y pruebas de fertilidad	96
<u>5. DISCUSION</u>	102
5.1. Análisis del efecto ejercido por los procesos de congelación sobre la función espermática "in vitro"	102
5.2. Incidencia del factor individual sobre la reacción acrosómica "in vitro" en el semen de morueco congelado. Efectos sobre fertilidad	106
5.3. Correlaciones entre analítica de laboratorio y pruebas de fertilidad	108
<u>6. CONCLUSIONES</u>	112
<u>7. RESUMEN</u>	113
<u>8. ABREVIATURAS</u>	115
<u>9. BIBLIOGRAFIA</u>	116

1. INTRODUCCION

1.INTRODUCCION.

La inseminación artificial se muestra como un instrumento extremadamente útil para la mejora genética. No obstante, el empleo de la inseminación artificial en la especie ovina solo aumenta la capacidad media de difusión de los moruecos en una relación de 1 a 10 con respecto a la monta natural, mientras que en la especie bovina esta relación se encuentra entre 1/100 y 1/1000. En efecto, el estado actual de la técnica en el ganado lanar presenta unas limitaciones biológicas y zootécnicas (Graham, 1978; Vijil, 1986), que hacen que la inseminación artificial ovina se practique únicamente sobre celo sincronizado e inducido aplicando semen fresco o refrigerado, a títulos bajos de dilución. Este último hecho se debe fundamentalmente a la baja rentabilidad obtenida con la aplicación de semen congelado por vía cervical.

Una práctica muy común, para mejorar los bajos resultados de fertilidad, ha sido incrementar el número de espermatozoides por dosis, sin embargo, se ha comprobado que con ello no aumentan los porcentajes de gestación esperables. Por lo tanto, los procesos de congelación-descongelación, además de ocasionar la muerte de un gran número de células espermáticas podrían alterar la fisiología de los espermatozoides que sobreviven a la congelación.

El espermatozoide es una célula altamente especializada y diferenciada que para cumplir su función debe, después de ser eyaculado, experimentar una serie de cambios en el aparato genital femenino que le aporten su capacidad fecundante. Estos cambios se conocen con el nombre de CAPACITACION ESPERMATICA y van a desencadenar a su vez, otras dos modificaciones sobre el espermatozoo. En primer lugar, originan un aumento en la motilidad denominado HIPERACTIVACION, para posteriormente promover un evento exocitótico entre la membrana plasmática y la acrosomal externa conocido como REACCION ACROSOMICA.

Los procesos de congelación-descongelación, afectan fundamentalmente al sistema de membranas celulares. Estas alteraciones a nivel de membrana son debidas principalmente al enfriamiento, dilución y congelación. Esto trae como consecuencia el acúmulo masivo de calcio en el interior celular, y por tanto la fusión de la membrana plasmática y la acrosomal externa, provocando una reacción acrosómica acelerada en las células espermáticas que sobreviven a los fenomenos de congelación. La congelación va a modificar también, las características de la

movilidad espermática incrementándose la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide. En consecuencia, estos espermatozoides congelados-descongelados tendrán una vida mucho más reducida en el tracto genital de la hembra; si esto fuese así podría asegurarse que los fenómenos que acontecen en el espermatozoide de morueco durante la congelación van a desencadenar en dichas células un grado de capacitación, por lo que el espermatozoide va a estar preparado para fertilizar en menos tiempo.

Por otro lado un hecho muy analizado en la bibliografía consultada sobre congelación espermática es la influencia del factor individual en la congelabilidad del semen de morueco (Marinov y Dacheva, 1984; G^a Artiga, 1992). Estas variaciones individuales post-descongelación se han reflejado tanto en los parámetros analizados "in vitro", como en los resultados de fertilidad obtenidos al aplicar las correspondientes dosis seminales. Sin embargo, no existe ningún estudio que analice en qué medida se ve afectada la funcionalidad de las células espermáticas que sobreviven a la congelación en función del morueco del que procedan. Teniéndose en cuenta que en caso de existir estas variaciones individuales entre moruecos, en cuanto a la funcionalidad de las células supervivientes este hecho podría afectar notablemente los resultados de fertilidad.

Otro objetivo muy importante a la hora de estudiar la congelación del semen ha sido el de evaluar el porcentaje de células espermáticas perfectamente funcionales y potencialmente fértiles tras la descongelación. Esto no resulta del todo fácil ya que hay que evaluar gran número de aspectos para poder conocer la cantidad de células viables en una muestra de semen. En consecuencia, hay que determinar realmente el número de células capaces de sufrir capacitación, reacción acrosómica, y fusionarse con el ooplasma del ovocito.

Por todo lo expuesto, el presente trabajo estudia los efectos de la congelación del semen de morueco sobre la fisiología de las células espermáticas supervivientes a la descongelación que pudieran intervenir en la aparición de un estado de capacitación prematuro, y que por tanto, fueran causas directas del bajo rendimiento de la técnica en esta especie, cuando el semen es aplicado por vía cervical. Para ello se ha estudiado, en primer lugar, la influencia de los procesos de congelación sobre la fisiología espermática "in vitro" en el semen de morueco. En segundo lugar, se ha pretendido analizar la incidencia del factor individual sobre la funcionalidad "in vitro" de las células espermáticas que sobreviven a los procesos de congelación para, así, determinar las repercusiones de este hecho sobre los resultados de fertilidad obtenidos al aplicar las dosis de un morueco determinado. Por último, se ha tratado

de estimar "in vitro", el poder fecundante del semen congelado de morueco, utilizando varias pruebas laboratoriales con objeto de determinar el porcentaje de espermatozoides potencialmente viables, entendiéndose como tal aquéllos capaces de sufrir la capacitación, reacción acrosómica y fusionarse con el ooplasma del ovocito.

1.1. OBJETIVOS

En resumen, en el presente trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Analizar la influencia de los procesos de congelación y de la temperatura de preincubación del semen de morueco sobre las características biológicas de las células espermáticas supervivientes a dicho proceso.
2. Estudiar "in vitro" la incidencia del factor individual sobre la presentación de la reacción acrosómica en el semen congelado de morueco, así como las repercusiones de estas variaciones individuales en la fertilidad "in vitro" e "in vivo".
3. Por último, hemos estimado "in vitro" el poder fecundante del semen de morueco congelado mediante el empleo de diversas técnicas de contrastación seminal.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2. REVISION BIBLIOGRAFICA.

2.1. MACHOS REPRODUCTORES Y RECOGIDA DE SEMEN.

El éxito de la inseminación artificial ovina (I.A.O) depende, inicialmente, de la calidad del semen empleado en la misma. Para que dicho semen presente unas características biológicas excelentes, se hace necesario que los sementales se encuentren en perfectas condiciones y que el método empleado para la obtención del mismo sea aplicado correctamente (Pérez García, 1958; Vijil, 1986; Hafez, 1989).

2.1.1. Manejo de reproductores

Para obtener unos eyaculados de óptima calidad, en primer lugar, debe prestarse una atención especial a los moruecos seleccionados como sementales, los cuales precisan un manejo adecuado (Evans y Maxwell, 1990).

Las bases de la selección deben seguir la misma normativa que para los sementales destinados a la monta natural: ausencia de enfermedades, buen estado corporal y aplomos correctos (Vijil, 1986). Además, estos animales deben mostrar buena libido y eyaculados de calidad (Evans y Maxwell, 1990). Paralelamente a todos estos factores, a la hora de seleccionar un semental, se debe tener en cuenta el potencial genético del mismo (Evans y Maxwell, 1990).

El manejo de estos animales implica control de los siguientes factores: alojamiento, alimentación, programas sanitarios y régimen sexual (Hafez, 1989; Evans y Maxwell, 1990). La frecuencia óptima de recogida de semen es aquella que nos proporciona el mayor número de espermatozoides con el mínimo de recogidas semanales durante un periodo de tiempo dado (Cole y Cupps, 1984; Vijil, 1986). Se ha podido constatar que el ritmo de recogidas influye notablemente sobre las características del eyaculado en el morueco (Cameron et al., 1984; Vijil, 1986). Efectivamente, al aumentar el número de recogidas, disminuye el número de espermatozoides en cada una de ellas. Los ritmos de recogida más frecuentemente empleados, en la especie ovina, para la realización de experiencias de larga duración, son de un eyaculado/vez/semana (Colas, 1980) ó bien de un eyaculado/dos veces/semana (Colas, 1984). Dos eyaculaciones diarias permiten obtener el máximo número de espermatozoides por día en moruecos sometidos a un régimen regular de recogida (Cameron et al., 1984).

Por otra parte, existe una serie de características individuales del semental, cuya interrelación con los factores del medio resultan de interés para calibrar su capacidad reproductora. De entre ellas, las más importantes son la edad y la acción del fotoperiodo (Cole y Cupps, 1984; Colas et al., 1985; Vijil, 1986). En experiencias realizadas con moruecos de distintas razas, se ha comprobado que los animales sometidos a fotoperiodo decreciente, presentan una calidad seminal siempre superior a la de los machos sometidos a fotoperiodo creciente (Colas et al., 1985; Vijil, 1986). En este sentido se ha estudiado también la influencia del fotoperiodo sobre la capacidad de conservación del semen de morueco. Así Fiser y Fairfull, (1986) obtuvieron una alta correlación entre la congelabilidad del semen de morueco y el fotoperiodo, apreciando que el semen recogido en días cortos presentaba una mejor calidad post-descongelación que aquel obtenido durante los días largos.

El efecto de las horas de luz sobre la calidad seminal, estará influenciado también por la raza del semental en cuestión. Así la raza Manchega mantiene durante todo el año un comportamiento copulatorio y unas características seminales compatibles con un nivel reproductivo regular aunque registra una variación estacional en tales parámetros, encontrando los valores mínimos producidos en primavera (Pérez García et al., 1987).

2.1.2. Recogida de semen.

La obtención del semen es el primer paso dentro de un programa de inseminación artificial (I.A.) ganadera. Esta labor resulta de gran importancia, no sólo para la obtención de eyaculados de óptima calidad (Pérez García, 1958; Vázquez et al., 1986; Howard y Pace, 1988), sino también para la utilización adecuada de los sementales empleados en tales programas, consiguiéndose así una vida sexual prolongada para los mismos (Pérez García, 1958).

2.1.2.1. Vagina Artificial

El método de obtención de semen más comúnmente difundido para la mayoría de las especies de mamíferos es el de la vagina artificial (Cole y Cupps, 1984; Hafez, 1989).

En la especie ovina también es la vagina artificial el método alternativo para la recogida del material seminal (Inskeep, 1974; Memmon y Ott, 1981; Vázquez et al., 1986).

El profesor italiano Giuseppe Amantea, en Roma, en el año 1.914, diseñó la primera vagina artificial, utilizándose para la obtención de semen en el perro. Ivanov, en 1.931 adaptó este diseño para el ganado ovino en el Instituto de Inseminación Artificial de Moscú, siendo perfeccionada posteriormente, en 1.939, por Takin. Durante los años 50, el profesor italiano T. Bonadonna aporta algunas modificaciones al modelo ruso (Pérez y Pérez, 1985). En esta época también se realizaron modificaciones por otros autores (Carbonero, 1951).

La vagina artificial intenta replicar, en la medida de lo posible, la vagina de la hembra (Vijil, 1986; Howard y Pace, 1988; Evans y Maxwell, 1990). Es por ello, por lo que Bonadonna denominó a este método de recogida de semen, recogida parafisiológica o coito parafisiológico.

El mayor inconveniente que presenta la utilización de la vagina artificial es, la necesidad de entrenar a los sementales para que eyaculen dentro de dicho dispositivo (Inskeep, 1974; Evans y Maxwell, 1990).

2.1.2.2. Otros sistemas de recogida.

Junto al método de la vagina artificial, universalmente aceptado, se utilizan otras técnicas con idéntico propósito, y de mayor o menor aceptación entre los distintos autores. Así tenemos, la electroeyaculación (E.E.) (Vijil, 1986; Hafez, 1989; Evans y Maxwell, 1990), los colectores vaginales (Pérez y Pérez, 1985), y además, deben mencionarse otras técnicas aplicadas con carácter meramente experimental, como son las centesis genitales (Dacheux et al., 1984) y los condones de ubicación intravaginal (Synnott et al., 1981).

La utilización de los colectores vaginales para la obtención de semen fue establecida por Roemmele, en Alemania. Esta metodología consiste en situar un colector dentro de la vagina destinado a recoger el eyaculado post-coito. Dubois, en Bélgica, perfeccionó la técnica diseñando un colector vaginal de vidrio con dos receptáculos para la obtención de semen en el morueco. A pesar de los resultados satisfactorios registrados por dicho autor, la utilización de este colector no se ha generalizado debido a inconvenientes como los causados por rotura del colector en el interior de la vagina de la hembra o por pérdida del material seminal por desviaciones anatómicas, así como por contaminación de la muestra (Pérez y Pérez, 1985).

A finales del siglo pasado, se comenzó a utilizar los estímulos eléctricos para la obtención de semen, al comprobar que los individuos ejecutados en la silla eléctrica, eyaculaban simultáneamente a la descarga (Durán, 1980). Posteriormente, esta técnica se modificó adaptándose a las distintas especies animales. La forma y disposición de los electrodos ha evolucionado hasta llegar a los modelos actuales, en los cuales, el electroeyaculador presenta un sólo electrodo de aplicación rectal (Durán, 1980); siendo este método el más aceptado por la mayoría de los investigadores (Inskeep, 1974; Evans y Maxwell, 1990).

La utilización de la E.E. presenta una serie de inconvenientes, tales como contaminación por orina (Inskeep, 1974; Memmon y Ott, 1981), menor resistencia de estos eyaculados al choque térmico y a los procesos de congelación y descongelación (Cole y Cupps, 1984; Vijil, 1986) posibilidad de producir lesiones degenerativas, en los sistemas nervioso y muscular esquelético, por las contracciones tan bruscas que se ocasionan (Inskeep, 1974; Duran, 1980; Vijil, 1986; Evans y Maxweel, 1990). Como conclusión, a todo lo expuesto se debe señalar que la E.E. sólo debe utilizarse en sementales con elevado valor genético, que no respondan adecuadamente a la vagina artificial, ya sea por enfermedad o porque rehúsen a la misma (Cole y Cupps, 1984; Vijil, 1986; Howard y Pace, 1988; Hafez, 1989).

2.2. CONTRASTACION SEMINAL

El desarrollo de pruebas de laboratorio que anticipen de forma precisa el poder fecundante del semen ha supuesto siempre un gran reto para los investigadores dedicados a la I.A. (Graham et al., 1980; Saacke, 1983; Uwland, 1984; Hafez, 1989).

La única prueba definitivamente válida de la calidad real de una muestra de semen la constituye la fertilidad de las hembras inseminadas (Cole y Cupps, 1984; Vijil, 1986; Hafez, 1989), no obstante, existen técnicas laborales de contrastación seminal que utilizadas correctamente aportan datos, con distintos grados de correlación sobre la capacidad fecundante del esperma de un determinado semental (Graham et al., 1980; Cole y Cupps, 1984; Foote, 1988).

Para Graham et al. (1980) un ensayo ideal para la determinación de la calidad seminal debe reunir una serie de condiciones como: ser objetivo, repetible, fidedigno y económico.

Las pruebas más utilizadas son:

2.2.1. Motilidad

Es la capacidad de movimiento de la célula espermática. Este parámetro se ha utilizado de forma tradicional como única prueba para la contrastación del semen de morueco, ya sea recién recogido o después de ser sometido a distintos procesos de conservación (Graham et al., 1980; Memon y Ott, 1981; Uwland, 1984).

2.2.1.1. Motilidad Masal (M.M.)

Consiste en observar las ondas que produce una masa espermática en movimiento y debe realizarse inmediatamente después de la obtención del eyaculado en condiciones isotermas y sin diluir el mismo (Evans y Maxwell, 1989).

2.2.1.2. Motilidad Individual (M.I.)

Consiste en estimar el porcentaje (0-100%) de espermatozoides con movimiento en una muestra de semen diluido en una solución isosmótica (Evans y Maxwell, 1989; Fiser y Fairfull, 1989). Al mismo tiempo puede valorarse la calidad de ese movimiento en una escala de 0-4 (Robertson y Watson, 1986; Suttiyotin y Thawaiter, 1991) o de 0-5 en orden a la progresión de ese movimiento (Fiser y Fairfull, 1989; Pontbriand et al., 1989).

Fiser y Fairfull (1989) estiman también el porcentaje de motilidad y la calidad de ésta después de incubar el semen descongelado a 39°C durante una hora.

La motilidad espermática a pesar de ser indispensable para la fecundación, no pronostica de una forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide (Graham et al., 1980). Este hecho ha sido atribuido a la naturaleza subjetiva de la valoración visual de dicho parámetro (Graham et al., 1980; Uwland, 1984; Amann, 1988; Evans y Maxwell, 1989). Por ello se han realizado numerosos esfuerzos para poner a punto métodos que determinen de una forma más precisa y objetiva el porcentaje de espermatozoides motiles en una muestra de semen. Así se ha utilizado la fotografía de exposición múltiple (Katz y Overstreet, 1981), el test

de penetración de moco cervical (Mole y Fitzgerald, 1990), el filtro de sephadex (Graham et al., 1977); cámaras calibradas especiales (Makler, 1978), y más recientemente sofisticados sistemas de computadores (Amann, 1988).

Algunas de estas técnicas, además de su valoración objetiva permiten analizar otros parámetros relacionados con la motilidad (Amann, 1988; Evans y Maxwell, 1989), como son velocidad, tipo de movimiento y porcentaje de espermatozoides con rotación. No obstante, su difusión en el semen de morueco, es muy reducida, debido a que son metodologías que implican un material de alto coste y que además no pueden aplicarse "in situ" (Graham et al., 1980; Evans y Maxwell, 1989; Hafez, 1989).

2.2.2. Morfoanomalías.

La morfología espermática se considera reflejo del estado fisiológico del aparato reproductor frente a la producción de semen y almacenamiento del mismo en los conductos extragonadales (Saacke, 1983).

Los valores de morfoanomalías aceptables para un eyaculado varían con la especie, así para el morueco estos valores se hallan comprendidos entre el 15 (Uwland, 1984; Evans y Maxwell, 1984) y el 20% (Hafez, 1989), aunque no presentan una clara correlación con la fertilidad.

Existen diversas metodologías empleadas para la determinación de formas anormales. Se pueden detectar en extensiones de semen teñidas y examinadas por microscopía en campo claro, siendo la tinción más empleada la de Eosina-Nigrosina (Colas, 1980; Mickelsen et al., 1981). Además puede establecerse el grado de morfoanomalías por medio de la microscopía de contraste de fase previa inclusión de las muestras en solución salina formolada (Memon y Ott, 1981) o en una solución de glutaraldehído (Volgmayr et al., 1983).

2.2.3. Integridad Acrosómica.

El acrosoma es una estructura membranosa que ocupa la región anterior de la cabeza del espermatozoide, recubriendo al núcleo y que se origina a partir del complejo de Golgi durante la fase de espermátida. Este orgánulo contiene los enzimas que permiten al espermatozoide atravesar las envolturas que recubren al

ovocito. Dichos enzimas se liberan al exterior mediante un proceso de exocitosis denominado "Reacción Acrosómica".

Saacke y Marshall, en 1968, introducen un nuevo parámetro para la evaluación morfológica del eyaculado, al describir la secuencia de alteraciones que presenta el acrosoma del espermatozoide del toro con el transcurso del tiempo. A partir de aquí, la integridad del acrosoma se ha utilizado como prueba de calidad seminal en la mayoría de las especies de animales mamíferos, entre ellas la ovina (**Uwland, 1984**).

La normalidad acrosómica se valora de diversas formas según los autores. **Watson y Martin (1972)** emplean la microscopía de campo claro para el examen de muestras previamente teñidas con una solución de Giemsa al 6%. **Carbonero y Vázquez (1984)** y **Pontbriand et al. (1989)** utilizan una solución de glutaraldehído para fijar las muestras y evalúan, por medio de la microscopía de contraste de fase, el estado del borde apical del acrosoma. **Tasseron et al., (1977)** realizan esta determinación por medio del microscopio electrónico de transmisión. Finalmente, nosotros (**Garde et al., 1992**) hemos empleado el método descrito por **Talbot y Chacon (1981)** para espermatozoides humanos en la especie ovina.

Por último, los sistemas de clasificación de acrosomas, también difieren según los autores. **Pontbriand et al. (1989)** siguen la metodología descrita por **Pursel y Johnson (1974)** y distinguen: borde apical normal (NAR) correspondiente a espermatozoides con acrosoma intacto, borde apical dañado (DAR), borde apical perdido (MAR) y borde apical suelto (LAC). Por otro lado, **Fiser et al., (1986)** únicamente diferencian entre acrosomas intactos (PIA) y alterados.

2.2.4. Test de endósmosis celular.

Los espermatozoides de mamíferos bajo condiciones hipoosmóticas se "hinchon" debido al influjo de agua extracelular que origina la expansión de las membranas (**Drevius y Eriksson, 1966**), por lo tanto, sometiendo a los espermatozoides a estos medios se puede evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática (**Jeyendran et al., 1984**), ya que aquellos espermatozoides que aparecen con el flagelo hinchado y plegado helicoidalmente sobre la porción intermedia son los que mantienen su membrana plasmática funcional y permite el paso de agua al interior, para establecer el equilibrio osmótico entre los espacios intra y extracelular (**Jeyendran et al., 1984**).

El hinchamiento se evidencia más fácilmente en el flagelo espermático por ser en esta porción la membrana plasmática más flexible y estar más separada de las estructuras inferiores que en la cabeza (Vázquez, 1980; Jeyendran et al., 1984).

El test de endósmosis se ha aplicado para el control de la calidad seminal en varias especies animales, entre ellas la ovina, porcina y bovina (Vázquez, 1980; Watson y Duncan, 1988; Anel, 1990).

Las presiones osmóticas de los medios empleados para realizar esta prueba en la especie ovina oscilan entre 75 (Vázquez, 1980) y 150 mOsm/Kg. (Watson y Duncan, 1988), habiéndose observado que por debajo de dichas presiones los "lazos" formados en los flagelos se pierden al reventar las membranas plasmáticas (Jeyendran et al., 1984).

La identificación se puede hacer por microscopía de contraste de fases (Jeyendran et al., 1984) o con contadores electrónicos que clasifican los espermatozoides de una muestras espermática en distintas subpoblaciones en función del tamaño (Vázquez, 1980).

2.2.5. Tinciones Vitales.

El contenido en espermatozoides vivos de una muestra de semen puede determinarse fácilmente mediante el empleo de técnicas de tinción en las cuales los espermatozoides muertos aparecen teñidos al presentar sus membranas mayor permeabilidad al paso de colorantes (Fiser y Marcus, 1989).

El porcentaje de células espermáticas muertas, en el semen de morueco, se ha estimado por diversas tinciones: Eosina-Nigrosina (Colas, 1980), Tripán azul (Suttiyotin y Thwaiter, 1991), Amaranto (Fiser y Marcus, 1989) y la triple tinción de Talbot y Chacon (1981) modificada para espermatozoides de morueco (Garde et al., 1992). Esta última técnica permite distinguir simultáneamente el estado del acrosoma y la viabilidad espermática.

2.2.6. Fecundación "in vitro".

Los métodos rutinarios de contrastación seminal, no presentan, en general, una buena correlación con los resultados de fertilidad "in vivo" (Graham et al.,

1980; Foote, 1988). Ello es debido, en parte, a que la fertilidad es un fenómeno complejo en el que intervienen multitud de factores como: transporte espermático, capacitación, maduración de ovocitos, ovulación, estado endocrino de la hembra y desarrollo embrionario normal (First y Parrish, 1987).

Por ello, en los últimos años se han empezado a utilizar los sistemas de Fecundación "in vitro" (FIV), ya sean homólogos o heterólogos, para determinar las posibilidades fecundantes de los reproductores. Yanagimachi et al., (1976) desarrollan una prueba de FIV heteróloga, denominada prueba de penetración espermática (SPA) o test de hamster, en la cual se estima el potencial fecundante de un eyaculado, en base a su capacidad para penetrar ovocitos de hamster libres de zona pelúcida. Este test se ha correlacionado con datos de fertilidad "in vivo" en la especie humana (Yanagimachi et al., 1976) bovina (Bousquet y Brackett, 1982; Graham y Foote, 1987) y porcina (Berger y Parker, 1989). Mientras que en ganado ovino se ha utilizado únicamente de forma experimental para estudiar aquellos fenómenos que afectan a la capacitación y R.A. (Slavik, 1987); Graham et al., 1991), no habiéndose empleado hasta el momento para valorar la calidad de un eyaculado (Evans y Maxwell, 1989).

First y Parrish (1987) señalan que con la utilización de sistemas de FIV homólogos se puede conseguir una mayor proximidad a los resultados de fertilidad, ya que en ellos las condiciones de estudio se acercan más a lo que sucede "in vivo". Esta técnica se ha utilizado para valorar semen de toro (Ohgoda et al., 1988) y recientemente se ha iniciado su empleo en verraco (Coy, 1991; Mattioli et al., 1991; Vázquez, 1991), pero la FIV homóloga presenta el inconveniente de necesitar ovocitos intactos de la especie en cuestión, reduciéndose así las posibilidades de empleo de la técnica de una forma considerable. Por ello en la actualidad, parece tener más aceptación el SPA (Martínez et al., 1989), no obstante esta prueba necesita ser estudiada más ampliamente para poder desarrollarse de forma rutinaria en la contrastación del semen de morueco (Evans y Maxwell, 1989).

2.2.7. Pruebas Bioquímicas.

Además de las pruebas mencionadas anteriormente, debemos destacar aquellas técnicas que se basan en estudios químicos y bioquímicos del semen.

Así se ha valorado la concentración de distintas enzimas presentes tanto en el plasma seminal como en el espermatozoide, los cuales pueden indicar qué parte

de la estructura celular en la dañada (Graham et al., 1984; Nath y Patt, 1970).

También se pueden utilizar diversos análisis para estimar el contenido en distintas sustancias, como sodio, potasio, fructosa, proteínas totales, ácido cítrico, etc. (Marinov y Dacheva, 1984; Borque et al., 1989).

2.3. CONGELACIÓN DE SEMEN DE MORUECO.

La primera referencia sobre la crioconservación del semen se debe a **Spallanzani (1776)**, el cual observó que los espermatozoides de hombre, caballo y rana llegaban a una inactividad total tras ser enfriados en nieve durante un tiempo superior a 30 minutos, recuperando posteriormente su actividad al ser calentados. Por lo tanto, se conoce desde hace mucho tiempo que el hecho de reducir la temperatura implica una disminución de la actividad metabólica de los gametos, prolongándose con ello la vida media de los mismos.

En los dos últimos siglos, se han desarrollado y perfeccionado numerosas técnicas con objeto de conseguir nacimientos mediante la aplicación de dosis seminales congeladas (**Watson, 1979**). Así, se han obtenido grandes avances en la congelación del semen de toro; mientras que en otras especies, como la ovina, los resultados de fertilidad han sido inconsistentes y extremadamente bajos como se deduce de la mayoría de los estudios publicados (**Salamon y Visser, 1974; Graham et al., 1978; 1984**). Los bajos porcentajes de gestación asociados al empleo de semen de morueco congelado han sido atribuidos al daño del acrosoma en las células espermáticas criopreservadas (**Tasseron et al., 1977**), a la viabilidad reducida de los espermatozoos de morueco en el tracto genital de la oveja (**Mattner et al., 1969**), al fallo en el transporte espermático en el aparato genital femenino (**Lighfoot y Salamon, 1970**), al efecto tóxico del glicerol (**Abdelhakeam, 1988**) y a la imposibilidad de atravesar el cervix que presentan las células espermáticas supervivientes (**Armstrong y Evans, 1984**).

La respuesta de los espermatozoides a los procesos de congelación-descongelación varía entre las especies (**Fiser, 1989**), e incluso entre individuos dentro de una misma especie (**Maxwell, 1986**). Esto parece ser debido a diferencias en la composición de las membranas, lo cual determina requerimientos específicos entre especies en la composición de los diluyentes.

2.3.1. Diluyentes empleados en la congelación del semen de morueco.

El empleo de medios diluyoconservadores permite prolongar la viabilidad de la célula espermática, rentabilizar los eyaculados obtenidos y conservar las dosis por un período amplio de tiempo. Diversas soluciones preparadas a base de leche desnatada, se han empleado como diluyentes para la congelación del semen de morueco, aportando resultados de viabilidad muy satisfactorios en la descongelación (Colas, 1975). Más recientemente, se han utilizado diluyentes sintéticos, los cuales contienen junto a pequeñas proporciones de leche o yema de huevo, azúcares y electrolitos (Salamon y Visser, 1972; Graham, 1978). Estos diluyentes aportan un grado de protección, durante los procesos de congelación-descongelación, comparable y en algunos casos superior al que ofrecen los diluyentes a base de leche inactivada o de yema de huevo.

Phillips (1939), fué el primero en informar que la inclusión de yema de huevo en el diluyente prolongaba la viabilidad del semen de toro conservado a +10°C. Posteriormente se comprobó el mismo efecto de la yema de huevo sobre la conservación del semen de morueco (Jones y Martin, 1973), a partir de ello, este compuesto se ha convertido en un constituyente común de los diluyentes seminales de la mayoría de las especies mamíferas (Graham et al., 1978).

Los diluyentes seminales deben cumplir unos requisitos de pH, capacidad tampón, osmolaridad y fuerza iónica. Además, han de contener una fuente de energía para el espermatozoide, no deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso y sobre todo deben proporcionar a la célula espermática protección frente a los efectos de la bajada de temperatura, refrigeración, congelación y descongelación (Mann, 1964; Graham, 1978; Watson, 1979).

La mayoría de los diluyentes recomendados para la crioconservación del semen ovino son hipertónicos con respecto al plasma seminal (Watson, 1979; Fiser et al. 1981, 1982; Fiser y Fairfull, 1986). Estos diluyentes producen menos lesiones que los isotónicos (Mann, 1964), ya que inducen mayor deshidratación de la célula y en consecuencia reducen el volumen de agua intracelular y por tanto el hielo formado durante la congelación (Watson, 1979). Las tasas de supervivencia espermática post-descongelación son superiores a las que se obtienen con medios isotónicos (Fiser et al., 1981).

En cuanto al pH óptimo de los diluyentes empleados para la congelación de las células espermáticas de mamíferos, éste debe estar próximo a la neutralidad

(Colas, 1975; Fiser et al., 1981). Para poder mantener un pH adecuado es necesario utilizar soluciones tampones. Entre las soluciones tampones más empleadas se encuentran las de fosfato, citrato y bicarbonato sódico (Visser y Salamon, 1974; Hunton et al., 1987). Los compuestos zwitteriónicos orgánicos (Good), como el TES, TRIS, BES, HEPES, MES, PIPES y TRICINE, han demostrado tener una mayor capacidad estabilizadora que los citados anteriormente debido a la fortaleza de su pK (Salamon y Visser, 1972; Graham, 1978; Vázquez et al., 1988; Pontbriand et al., 1989).

La adición de azúcares a los diluyentes para la congelación de semen tiene un efecto beneficioso sobre la vitalidad e integridad acrosómica de la célula espermática (Martin Rillo et al., 1980). Estos azúcares aportan la energía necesaria para que el espermatozoide desarrolle sus procesos metabólicos (Evans y Maxwell, 1989), habiéndose verificado que los espermatozoos unicamente pueden glicosilar la glucosa, fructosa y manosa (Mann, 1964); mientras que por vía oxidativa emplean también la arabinosa (White et al., 1954). Además los azúcares actúan como sustancias crioprotectoras contribuyendo a mantener el equilibrio osmótico (Meryman, 1971). En este sentido, son los azúcares de elevado peso molecular (di- y trisacáridos) los que mayor protección aportan al situarse recubriendo la membrana plasmática y disminuyendo los efectos lesivos de la concentración de solutos (Unal et al., 1978).

Las lesiones debidas a la criopreservación sobre las estructuras celulares pueden atenuarse mediante la inclusión de agentes crioprotectores en la elaboración de los diluyentes. Estas sustancias protegen durante los procesos de congelación y descongelación. Numerosas sustancias han sido identificadas por su acción crioprotectora y muchas de ellas se han utilizado con espermatozoides (Polge et al., 1949; Salamon, 1968; Jeyendran y Graham, 1980). Los crioprotectores pueden clasificarse en penetrantes (metanol, glicerol, dimetilsulfóxido, etilen glicol, 1-2 propanodiol, acetamida) y no penetrantes (azúcares, lipoproteínas de la yema de huevo y proteínas de alto peso molecular) en función de su permeabilidad para las membranas plasmáticas.

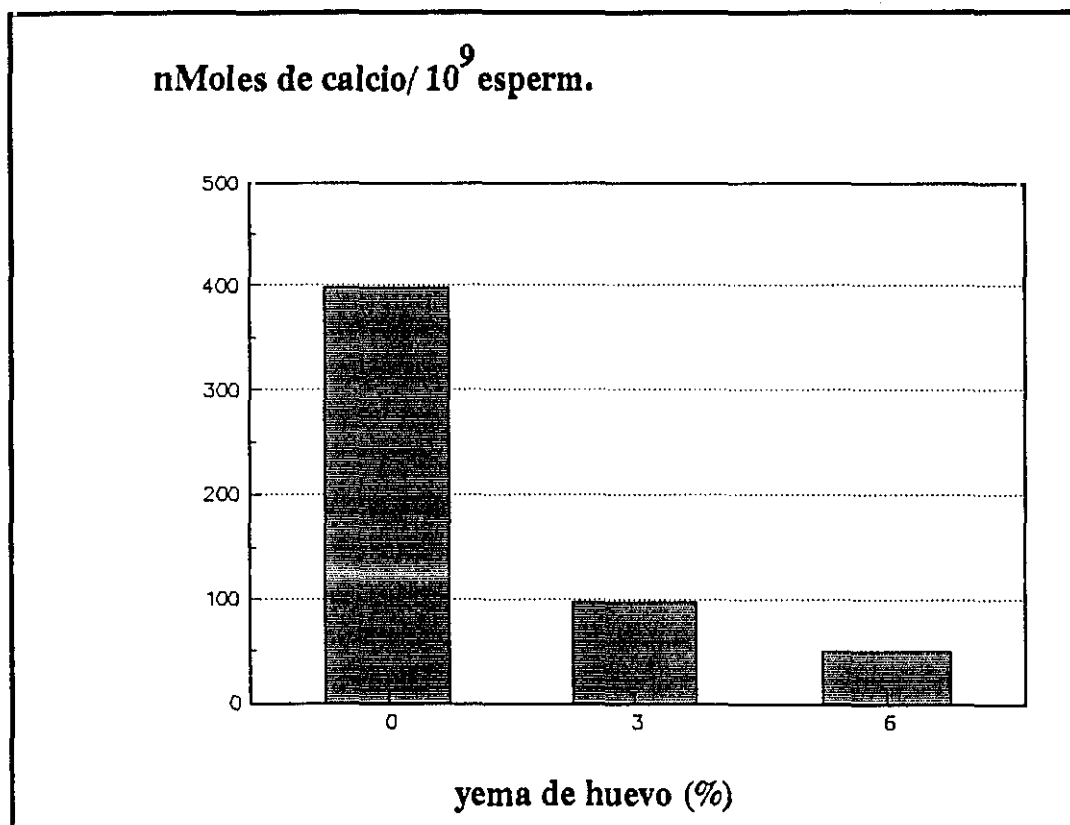


FIGURA 1: Efecto de la adición de distintos porcentajes de yema de huevo sobre la entrada de calcio en el espermatozoide de morueco después de la dilución del semen (ROBERTSON Y WATSON, 1986).

El mecanismo de acción de estos compuestos no es totalmente conocido. Se sabe que los penetrantes se introducen en la célula de forma uniforme (García Matamoros, 1980), provocando la deshidratación celular por sustitución del agua intracelular y evitando así el incremento de la concentración de solutos (Meryman, 1971), siendo más efectivos cuando las velocidades de congelación son bajas (Nagase et al., 1968). Por el contrario, los no penetrantes se sitúan recubriendo la membrana plasmática e inducen la formación de cristales de hielo alrededor de la misma, siendo más efectivos en congelaciones rápidas (Nagase et al., 1968).

Los crioprotectores más empleados en la congelación de semen de morueco son el glicerol y la yema de huevo de gallina, la cual debe su efecto protector a las lipoproteínas de baja densidad (Watson y Martin, 1975). Estas sustancias recubren la superficie de la célula espermática a modo de camisa reversible durante la congelación y descongelación por una unión lábil que se realiza entre los lípidos de

la yema y las lipoproteínas de la membrana plasmática (Watson, 1975), bloqueando así la entrada de iones de calcio a la célula (Robertson y Watson, 1986) (FIGURA 1). El glicerol, a pesar de ser comunmente empleado para la congelación del semen, presenta cierto grado de toxicidad para la propia célula espermática (Bower et al., 1973), por ello la concentración de glicerol utilizada en la congelación del semen ovino se ha reducido hasta el 4% - 8% (Lightfoot y Salamon, 1969a; Colas, 1975; Graham, 1978; Fiser et al., 1981; Vázquez et al., 1986). Recientemente, se ha demostrado que el glicerol tiene una acción desestabilizadora sobre la membrana plasmática que induce la reacción acrosómica (Slavik, 1987).

2.3.2. Tratamiento del semen para su congelación.

La metodología empleada para la congelación del semen incluye una serie de fases (dilución, refrigeración, envasado y velocidades de congelación y descongelación) que pueden afectar directamente a la recuperación de las células criopreservadas (Leibo, 1981; Fiser, 1989).

2.3.2.1. Dilución espermática.

La supervivencia de los espermatozoides en el propio plasma seminal está limitada a unas pocas horas, por tanto el semen debe diluirse para mantener la viabilidad espermática y evitar así la pérdida de viabilidad producida por el consumo de los componentes energéticos del plasma seminal por los espermatozoides. La dilución debe realizarse entre los 10-20 minutos de la obtención seminal, ya que de esta forma se obtienen unas motilidades postdescongelación superiores a cuando se diluye inmediatamente tras la recogida (Schmehl et al., 1986). Este hecho parece ser debido a las interacciones existentes entre las proteínas del plasma seminal y la membrana plasmática durante dicho periodo de espera (Viruela y Rajaniemi, 1983).

El semen de morueco generalmente es diluído después de su obtención en condiciones isotermas a 30-37°C (Visser, 1974; Graham, 1978). No obstante, se han encontrado numerosas posibilidades de dilución en cuanto al momento y temperatura de la misma, obteniéndose resultados postdescongelación que varían según los diversos autores (Fiser y Fairfull, 1984; García Artiga, 1992). En cuanto al grado de la dilución todos los estudios revisados indican que títulos intermedios son los que mejores resultados aportan a la descongelación (Lightfoot y Salamon, 1969a; Visser, 1974; García Artiga, 1992).

2.3.2.2. Refrigeración y equilibración.

La reducción gradual de la temperatura disminuye el nivel del metabolismo celular prolongando así la vida útil de los gametos masculinos (Gomes, 1984). Los espermatozoides de mamíferos, especialmente los pertenecientes a los ungulados, son extremadamente sensibles al enfriamiento rápido (Wales y White, 1959). Este fenómeno, conocido como "CHOQUE FRIO", depende de la velocidad de enfriamiento (Chang y Walton, 1940), del rango absoluto de temperatura que se descienda y de la temperatura final que se alcance (Quinn et al., 1980). Para evitar los efectos adversos del choque frío se emplean velocidades de refrigeración moderadas y homogéneas ($-0,1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ a $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$), las cuales descienden la temperatura del semen de 30°C a 5°C en periodos de tiempo de una a dos horas (Graham, 1978; Fiser y Fairfull, 1984; Vázquez et al., 1987).

Numerosos trabajos revisados (Blackshaw, 1954; Quinn et al., 1980; Watson, 1981), destacan el poder protector de las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo, frente a los efectos nocivos del choque frío sobre las células espermáticas. En este sentido, Fiser y Fairfull (1989), indicaron que añadiendo un 25% de yema de huevo al diluyente de congelación de semen de morueco, éste podía enfriarse rápidamente de $+30^{\circ}\text{C}$ a $+15^{\circ}\text{C}$, sin afectarse la viabilidad posdescongelación del espermatozoide. Watson y Martin (1975), reportan que la yema de huevo protege frente al choque frío cuando ésta es añadida al semen a $+30^{\circ}\text{C}$, mientras que cuando se adiciona a $+4^{\circ}\text{C}$ su efecto protector es insuficiente.

Otro aspecto importante dentro de la tecnología de la congelación seminal es el tiempo de equilibración, el cual se define como el periodo que transcurre desde que se añade el glicerol hasta que se se congelan las células espermáticas (Graham et al., 1978). Actualmente no está establecido aún cual es el momento óptimo para la adición de glicerol al semen de morueco, y por lo tanto tampoco se conoce cual debe ser el tiempo de equilibración adecuado. Así se han realizado ensayos de congelación de semen para diversos tiempos de equilibración, encontrándose recuperaciones post-descongelación variables según los diversos autores. No obstante, intervalos de equilibración comprendidos entre 30 min. y 2 horas aportan viabilidades del semen descongelado superiores a cuando se prolonga este tiempo (Patt y Nath, 1969; Jones, 1969).

El glicerol puede incorporarse al semen a la temperatura de $+30^{\circ}\text{C}$ (Jones, 1969; Lighfoot y Salamon, 1969a; Graham, 1978), cuando el semen previamente

diluido alcanza los $+5^{\circ}\text{C}$ (Colas, 1975; Fiser y Fairfull, 1984), ó 5 min. antes de iniciarse la congelación (Fiser et al., 1989). Ello se debe a que el semen y el glicerol interaccionan inmediatamente, por lo que un intervalo de 5 min. puede ser suficiente para que la célula espermática y el crioprotector se equilibren (Fiser et al., 1989; Watson, 1990). Ultimamente se denomina tiempo de equilibración, al intervalo necesario para que las membranas espermáticas se estabilicen en las bajas temperaturas ($+5^{\circ}\text{C}$) y toleren así el movimiento de agua que se produce a través de ellas durante la congelación. Durante este periodo de tiempo los fosfolípidos de las membranas deben reagruparse y desplazar a las proteínas, para que las membranas aparezcan más resistentes, es decir, durante este periodo de tiempo se produce una reestructuración de la membrana celular que hace que ésta sea más resistente a la congelación (Watson, 1992; comunicación personal).

2.3.2.3. Velocidades de congelación y descongelación.

Todas las células que han sido congeladas presentan una velocidad óptima de congelación, fuera de la cual los resultados de supervivencia se ven afectados (Graham et al., 1978).

La velocidad óptima de congelación del semen se ve afectada por una serie de factores, unos inherentes al propio espermatozoide (especie, dimensiones de la célula, permeabilidad de la membrana celular al agua y a los crioprotectores) y otros dependientes del proceso de congelación (concentración y tipo de crioprotector, geometría del envase y composición de los diluyentes) (Fiser, 1989; Watson, 1990). Con respecto a la concentración del glicerol se ha observado que para cada concentración del mismo los espermatozoides de morueco, toleran distintas gamas de velocidades de congelación, obteniéndose los mejores resultados de supervivencia para concentraciones del 4 al 6% y velocidades de enfriamiento de -10 a $-100^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ (Fiser y Fairfull, 1984), en general, al disminuir la concentración de glicerol las velocidades óptimas de congelación deben ser superiores.

El grado óptimo de congelación de los espermatozoides de morueco se encuentra entre -10°C y $-100^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ (Fiser y Fairfull, 1984) ó -60°C y $-100^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ (Watson, 1992, comunicación personal).

El rango crítico de temperatura para la supervivencia de los espermatozoides durante la congelación se encuentra entre los -10°C y los -40°C (Lovelock y Polge, 1954; Polge, 1957; Watson y Martin, 1975), por lo tanto, cuánto antes pasen este

intervalo mayor será la recuperación post-descongelación (Watson, 1990).

Otro aspecto importante que incide sobre la viabilidad de las células espermáticas congeladas es la velocidad de descongelación (Bank y Brockbank, 1987). La velocidad óptima de descongelación depende en gran medida de la técnica aplicada para la congelación (Robbins et al., 1976; Fiser et al., 1986). Cuando se utilizan velocidades de congelación altas los mejores resultados post-descongelación han sido obtenidos con descongelaciones también rápidas (Fiser et al., 1986). Por el contrario, si la congelación se realiza con velocidades lentas y la descongelación es rápida, no se concede a la célula espermática el tiempo suficiente para que reestablezca el equilibrio osmótico con el medio externo (Leibo, 1981), originándose la entrada de agua al interior del espermatozoo, provocando la ruptura de estructuras celulares (Mazur, 1980; Fiser et al., 1986).

En general, se emplean velocidades de descongelación rápidas. Tasseron et al. (1977), afirman que velocidades de descongelación de $+280^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ aportan resultados de recuperación espermática superiores a cuando se emplean velocidades de $+18$, $+37$, $+49$ ó $+120^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ Fiser et al. (1986), reportan que de las seis velocidades estudiadas ($+1$, $+2$, $+20$, $+80$, $+450$ y $+960^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) es la de $+960^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ la que mejores resultados post-descongelación aporta.

2.3.2.4. Envasado para la congelación.

El semen ovino ha sido envasado para su congelación, utilizando ampollas, píldoras y pajuelas. La introducción de estos dos últimos métodos en 1964 (pajuelas: Cassou, 1964; píldoras: Nagase y Niwa, 1964), supuso un gran avance dentro de la tecnología de la congelación seminal (Watson, 1990). El empleo de píldoras y pajuelas permite obtener velocidades de congelación más rápidas y repetibles, así como congelaciones uniformes dentro de la misma dosis (Martin et al., 1979).

El volumen de los envases empleados en la congelación del semen de morueco oscila de 0,5-1,2 ml. para las ampollas de cristal (Jones, 1969), de 0,013-0,86 ml. para las píldoras (Ligtfoot y Salamon, 1969b; Vázquez et al., 1988) y de 0,25-0,50 ml. para las pajuelas (Colas, 1975; Fiser et al., 1986; García Artiga, 1992).

A pesar de haberse realizado pocas comparaciones directas de motilidad y fertilidad en semen congelado bajo la forma de píldoras o pajuelas, el sistema de píldoras ha sido el más utilizado. **Salamon (1967)** y **Schmehl et al. (1986)**, afirman que la motilidad post-descongelación es superior cuando el semen es envasado en píldoras que cuando se congela en pajuelas. Sin embargo, otros autores refieren los mejores resultados de recuperación espermática cuando el semen es congelado bajo la forma de pajuelas (**Pontbriand et al., 1989**). En cuanto a los resultados de fertilidad obtenidos también son variables, así **Salamon (1967)**, no encontró diferencias de fertilidad para semen congelado en forma de ampollas, píldoras o pajuelas; mientras que otros autores han obtenido mayores tasas de fertilidad congelando en pajuelas (**Graham et al., 1978**).

2.3.3. Consecuencias del proceso de congelación sobre la célula espermática.

Los efectos lesivos provocados por la congelación sobre el espermatozoide se deben fundamentalmente a las agresiones originadas durante los procesos de refrigeración y de congelación propiamente dicho.

2.3.3.1. Efectos del choque frío.

Cuando el semen de ciertas especies de mamíferos es enfriado rápidamente a temperaturas próximas a los 0°C, un gran porcentaje de células espermáticas aparecen inmóviles, se incrementa el número de espermatozoides muertos y de formas anormales, alterándose la distribución de los lípidos de membrana y aumentando el calcio intracelular (**Watson, 1990**). **Milovanov (1934)**, denominó a este fenómeno "choque térmico", conociéndose actualmente como "choque frío" (**Watson, 1990**).

La susceptibilidad de los espermatozoides al choque frío se ve afectada en función de la especie animal de la cual provengan los gametos. En este sentido, se ha observado que las células espermáticas de morueco son altamente sensibles a este fenómeno, siendo las de conejo y hombre de las más resistentes (**Fiser, 1989**).

Las membranas celulares y la estructura acrosomal son las regiones espermáticas más afectadas por dicho proceso (**Pursel et al., 1972; Holt et al., 1992**). De igual modo que la estructura celular sufre alteraciones, la bioquímica

espermática es susceptible de modificaciones por el choque frío. Así, se han referido cambios del metabolismo espermático de los hidratos de carbono (**Mann y Lutwak-Mann, 1981**), pérdida de ciertas enzimas (**Moore et al., 1976**), eliminación de algunos lípidos de membrana (**Pickett et al., 1961**) y desequilibrios en la distribución de cationes (**Watson, 1990**). Este mismo autor indica que el choque frío induce a una alteración súbita e irreversible en las membranas celulares, cuyo efecto se ve acentuado por la incubación de las muestras a temperaturas de $+37^{\circ}\text{C}$, pero no a temperaturas de $+21^{\circ}\text{C}$. A partir de entonces numerosos autores han explicado estos hechos por una pérdida de componentes de membrana que aumenta la permeabilidad celular (**Watson, 1979**).

La susceptibilidad al choque frío viene determinada por el contenido de las membranas en colesterol y por la proporción de ácidos grasos poliinsaturados que éstas presenten en los fosfolípidos, ya que ambos fenómenos influyen en la fluidez de las membranas celulares (**Watson, 1979**). La relación colesterol/fosfolípidos es un hecho determinante de la fluidez de las membranas. El colesterol modula la fluidez de membranas por interacción con los ácidos grasos de los fosfolípidos.

Las especies que tienen elevadas relaciones colesterol/fosfolípidos son las que mejor resisten los cambios de temperatura. Así, **Darin-Bennett y White (1977)** observaron que en las especies resistentes al choque frío, conejo y hombre, la relación molar colesterol/fosfolípidos en sus membranas espermáticas era de 0,88 y 0,99 respectivamente; mientras que en las especies catalogadas como sensibles esta relación es inferior a 0,46 (ej. toro:0,45 y morueco:0,3). Con concentraciones similares de ambos grupos de lípidos, se mantiene la fluidez de la membrana y no se produce la separación lateral de las cadenas lipícas, por lo que las proteínas intrínsecas no son desplazadas, conservándose así la integridad del plasmolema.

Otros factores que influyen en la sensibilidad al choque frío, además de la especie de la cual procedan los espermatozoos, son el grado de maduración celular (**Quinn et al., 1969**), la variabilidad individual (**Pursel et al., 1973**) y la presencia de plasma seminal (**Quinn et al., 1968**). Estos parámetros van a incidir en la composición de las membranas celulares, originando variaciones en la estructura lipídica de las mismas, siendo estos hechos determinantes en la fluidez de la membrana plasmática.

El choque frío va a originar un aumento de la concentración de calcio intracelular que puede desencadenar procesos de fusión de membranas (**Watson, 1990**).

2.3.3.2. Efectos causados por la congelación.

Las suspensiones celulares, al enfriarse gradualmente por debajo del punto de congelación de la solución se superenfrian y empieza la formación de cristales de hielo en el exterior (espontáneamente o como resultado de la inducción a la cristalización), aumentando la concentración de solutos en el medio extracelular (Mazur, 1980; Watson, 1990). Sin embargo, el contenido de las células queda sin congelar ya que la membrana celular bloquea la expansión del hielo que casi siempre se forma en la solución externa. A medida que disminuye la temperatura, el agua celular sale de la célula como respuesta a la mayor presión osmótica externa y se congela. Uno de los factores externos que puede manipularse para la regulación de esta exósmosis es la velocidad de congelación (Fiser, 1989). Cuando la tasa de congelación es lo suficientemente lenta, los espermatozoides pierden el agua congelable por exósmosis evitándose así, la formación de hielo extracelular. Sin embargo, si las células se enfrian rápidamente el agua celular no abandona la célula antes de superenfriarse y entonces tiene lugar la formación de cristales intracelulares.

Mazur en 1965, propone que durante la congelación dos factores con dependencia opuesta de la velocidad de enfriamiento van a ser los causantes de los daños producidos por este fenómeno en cualquier tipo celular, existiendo una velocidad óptima de congelación fuera de la cual la supervivencia celular se ve comprometida.

El empleo de velocidades de congelación superiores a la óptima impide al agua intracelular abandonar la célula antes de superenfriarse y congelarse provocándose la muerte celular por la formación de cristales de hielo; mientras que cuando se emplean tasas subóptimas de congelación las lesiones se originan por la deshidratación celular, que trae consigo una prolongada exposición de las células a elevadas concentraciones de solutos, con deshidratación y aumento de la concentración del crioprotector, cambios de pH y precipitación de sales (Lovelock, 1953). Mazur (1965), denominó a todos estos cambios causados por el empleo de tasas de congelación lentas como "EFECTO SOLUCION". Por tanto, deben utilizarse velocidades de congelación intermedias que aumenten la tasa de supervivencia celular postdescongelación (Watson, 1990).

La formación de hielo intracelular va a originar la ruptura de ciertas estructuras celulares y la desorganización de las membranas plasmática y acrosomal, con alteraciones en la fase lipídica y desplazamiento de las proteínas intrínsecas (Mazur, 1980; Watson, 1990). La concentración de solutos produce la desnatura-

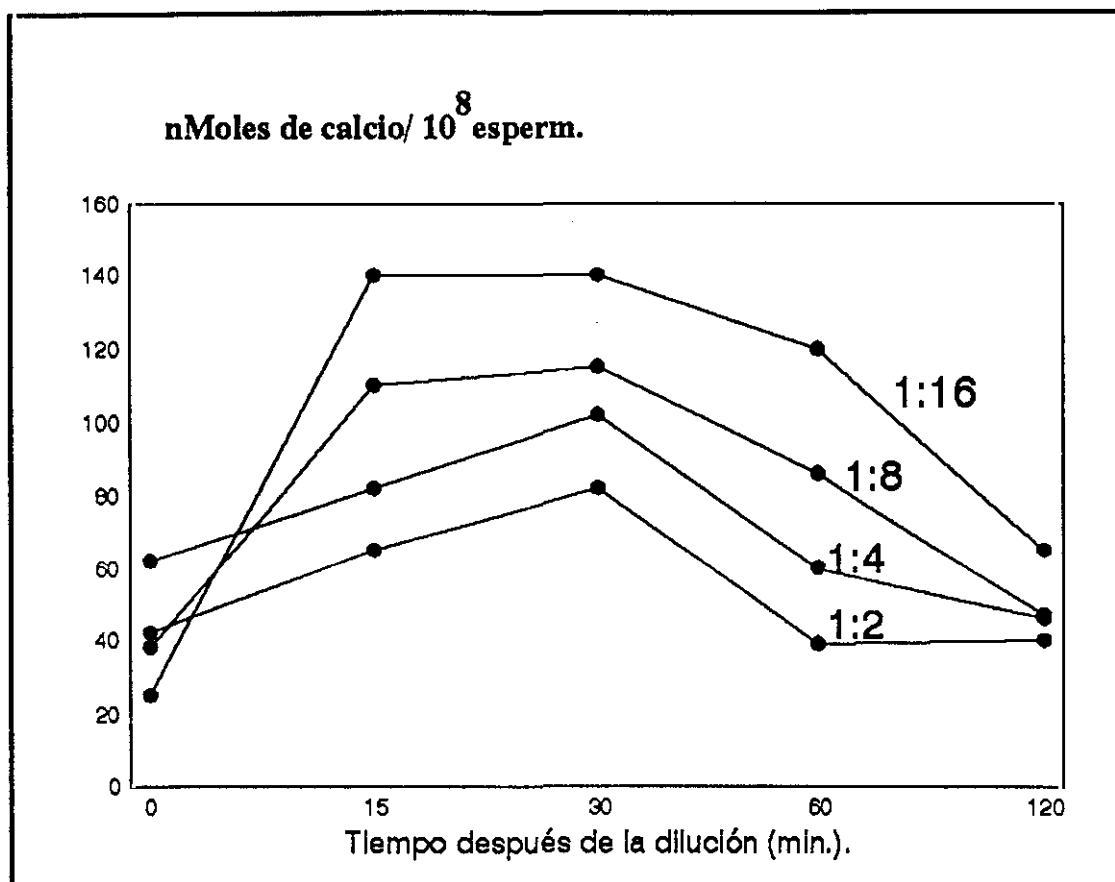


FIGURA 3: Efecto del grado de dilución sobre la entrada de calcio en la célula espermática (WATSON, 1990).

lización de los componentes de la membrana plasmática y la deshidratación celular disminuyendo su volumen hasta un mínimo donde se compromete la integridad estructural de la célula (Watson y Duncan, 1988).

2.3.3.3. Consecuencias biológicas de los procesos de congelación sobre las células espermáticas.

Cuando una muestra seminal es congelada y descongelada un gran número de espermatozoides aparecen fuertemente dañados y por tanto afuncionales. Sin embargo, recientes estudios demuestran que además las células espermáticas que resisten estos procesos pueden ver su función afectada (Watson, 1990). Actualmente, y a la vista de los trabajos realizados por los diferentes autores, se puede deducir que los fenómenos que acontecen en torno a la congelación van a alterar la fisiología de las células espermáticas, desencadenando un estado de capacitación prematuro que origina la reacción acrosómica de una forma acelerada (Wheeler y Seidel, 1986; Critser et al., 1987; Slavik, 1987; Berg et al., 1990;

Jabbour y Evans, 1991), acortándose con ello la viabilidad celular y por tanto el poder fecundante de dichas células (**Clarke y Johnson, 1987**), ya que tras sufrir la reacción acrosómica la vida del espermatozoide se encuentra muy limitada (**Yanagimachi, 1988**).

En la actualidad no se conoce con exactitud la causa desencadenante de este estado prematuro de capacitación, existiendo ciertas discrepancias entre los distintos autores. Así, se ha referido un incremento del porcentaje de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida por espermatozoides de morueco incubados en presencia de un 10% de glicerol con respecto a muestras control preincubadas en ausencia de dicho crioprotector, estableciéndose el glicerol como agente causal de estos fenómenos (**Slavik, 1987**). Sin embargo, también se ha demostrado un aumento en la tasa de fertilización de ovocitos homologos por semen ovino congelado, atribuyéndose este hecho a la inducción "in vitro" de la capacitación por tampones amino-orgánicos como el TES y el TRIS (**Berg et al., 1990**). No obstante, otros estudios realizados en la especie humana (**Critser et al., 1987**), bovina (**Wheeler y Seidel, 1986**) o porcina (**Clarke y Johnson, 1987**) atribuyen estos cambios en la función de la célula espermática a los procesos de congelación-descongelación propiamente dichos.

Para **Slavik (1987)**, el glicerol desencadenaría este estado prematuro de capacitación desestabilizando la membrana plasmática del espermatozoide al esterificarse con los ácidos grasos volátiles de los fosfolípidos de la membrana. Estos ácidos funcionan como elementos estabilizadores del acrosoma, por ello tras su eliminación (ie. por su unión a albúmina) las membranas espermáticas se desestabilizan y la RA se inicia (**Lui y Meizel, 1979**). Cuando los ácidos grasos se unen al glicerol se altera el equilibrio de los fosfolípidos de la membrana, aumentando notablemente los lisofosfolípidos, los cuales se comprobado desencadenan la reacción acrosómica en el cobayo (**Fleming y Yanagimachi, 1981**).

Según **Watson (1990)**, serían las lesiones originadas en las membranas durante el enfriamiento y la congelación las responsables de estos cambios. La dilución del semen va a originar una entrada de calcio a la célula espermática, siendo este influjo proporcional al grado de dilución (**FIGURA 3**), este exceso de calcio va a ser eliminado al exterior cuando los espermatozoides se mantienen a temperaturas que oscilan entre los +25°C y los +39°C por unas proteínas transportadoras denominadas "bombas de calcio".

De cualquier forma, todos los trabajos revisados demuestran que la fisiología

de las células espermáticas congeladas-descongeladas se ve alterada por procesos, tales como la dilución, refrigeración y congelación.

2.4. CAPACITACION ESPERMATICA Y REACCION ACROSOMICA

2.4.1. Capacitación y Reacción acrosómica "in vivo".

Los espermatozoides de la mayoría de las especies de mamíferos, madurados en el epididimo y eyaculados no están aún capacitados para fecundar. Dicha capacidad se adquiere después de permanecer durante algún tiempo en el tracto genital femenino y experimentar una serie de cambios que afectan a la composición y estructura de la membrana plasmática (Yanagimachi, 1988).

Este fenómeno fué referido inicialmente por Chang y Austin, en 1951, de forma independiente; siendo denominado por este último como "CAPACITACION ESPERMATICA". Hasta finales de la década de los sesenta la capacitación se definía como el tiempo que los espermatozoides debían residir en el aparato genital de la hembra para poder atravesar las distintas envolturas que recubren al ovocito y fusionarse con él. Posteriormente, se observó que para poder interaccionar con el ovocito, los espermatozoides debían sufrir unas modificaciones de naturaleza química, encontrándose entre ellas la eliminación de ciertos componentes proteicos que adquieren del plasma seminal, denominados en conjunto factor decapacitador (Yanagimachi, 1988). Actualmente se sabe que la capacitación es un proceso de desestabilización de las membranas espermáticas con eliminación o alteración de sustancias adsorbidas o integradas en la membrana plasmática, que ocasiona un influjo de calcio al interior de la célula espermática (Yanagimachi, 1988). Estas modificaciones originadas durante la capacitación van a desencadenar dos hechos imprescindibles para la fecundación en primer lugar se produce un incremento en la actividad de movimiento del flagelo espermático, acontecimiento que fue descrito por primera vez en el hámster dorado por Yanagimachi (1970), el cual lo denominó "HIPERACTIVACION". En cuanto al segundo aspecto consecuente a la capacitación, la liberación del contenido del acrosoma mediante un proceso exocitótico denominado "REACCION ACROSOMICA" (Barros et al., 1967) implica la formación de múltiples puntos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, originandose: la formación de pequeñas vesículas, la eliminación de la matriz acrosomal y la exposición de la membrana acrosomal

interna (Barros et al., 1967; Yanagimachi, 1988).

Algunos autores consideran que la capacitación es el inicio de la reacción acrosómica (Chang, 1984), mientras que otros opinan que son dos fenómenos independientes, si bien la reacción acrosómica depende de la capacitación para poder producirse (Ahuja, 1985; Yanagimachi, 1988).

Todas estas modificaciones, hacen que la célula espermática pase por diversas etapas durante su recorrido en el tracto genital de la hembra, que van de espermatozoide eyaculado → capacitado → reacción acrosómica → muerte celular, hecho que se produce rápidamente tras sufrir la reacción acrosómica (Didion y Graves, 1986). Por ello es muy importante que los procesos de ovulación y capacitación estén bien sincronizados, para que el encuentro de los gametos tenga lugar en el momento exacto en que ambos estén preparados para la fecundación (Hunter, 1988).

2.4.1.1. Transporte espermático al lugar de fecundación.

El movimiento de los gametos resulta esencial para que la fecundación se realice cuando el encuentro de ambos gametos se altera, se producen alteraciones en la fertilidad. El ovocito tarda en llegar desde el ovario a la ampolla del oviducto entre 30-45 minutos (Hunter, 1988), siendo su vida fértil en todos los mamíferos relativamente corta (Dodson et al., 1989).

Por otro lado, en la especie ovina, los espermatozoides alcanzan las trompas de Falopio entre las 6 y las 8 horas de la eyaculación (Hunter, 1986). Para llegar a este punto el gameto masculino debe atravesar por su propio movimiento el cérvix, siendo posteriormente transportado por las contracciones del miometrio uterino hasta la unión utero-tubárica. Los espermatozoides atraviesan esta unión, únicamente en virtud de su propia motilidad, permaneciendo en el lado oviductal de esta estructura anatómica evitando así ser fagocitados por polimorfonucleares neutrófilos (Hunter, 1990). Durante su paso por el cérvix, las células espermáticas son progresivamente liberadas del plasma seminal (Hunter, 1988) (FIGURA 4).

Una vez en la trompa, los espermatozoides son almacenados en la porción más caudal del istmo oviductal durante un tiempo de 17-18 horas, hasta justo antes de la ovulación (Hunter y Nichol, 1983; Hunter y Wilmut, 1984). El istmo, por lo tanto, es el reservorio espermático funcional (du Mesnil du Boisson y Dautier,

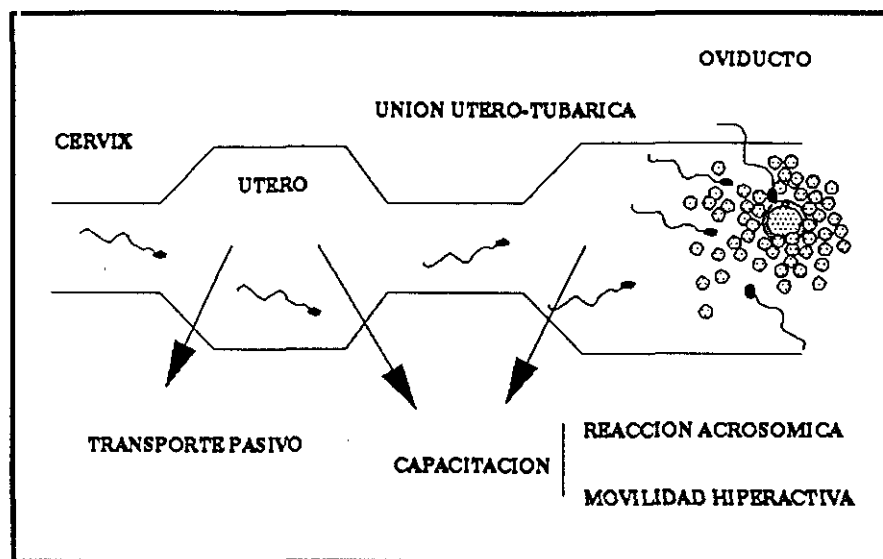


FIGURA 4: Representación esquemática del transporte espermático.

1955), en el cual los espermatozoides, con reservas metabólicas limitadas, quedan adheridos a las células epiteliales de la mucosa oviductal, presentando una reducción en su motilidad debido fundamentalmente a la secreción de proteínas altamente viscosas en esta región del oviducto (Hunter, 1991).

Cuando la ovulación llega, se produce la activación del movimiento espermático (hiperactivación), la liberación progresiva de los espermatozoides de la mucosa del istmo y el ascenso de los mismos de forma intermitente con alternancia de periodos de adhesión (Suarez, 1987; Smith y Yanagimachi, 1991) hacia la ampolla del oviducto. Este encuentro coordinado del gameto masculino y femenino está controlado por un mecanismo endocrino regulado por los folículos de Graaf (FIGURA 5), los cuales liberan ciertas sustancias de naturaleza hormonal que llegan por vía circulatoria local a las paredes del oviducto y desencadenan la activación de los espermatozoides (Hunter et al., 1983). Estos últimos deben haber sido capacitados a lo largo de la fase de transporte para poder sufrir la reacción acrosómica en las proximidades del ovocito y posteriormente penetrarlo.

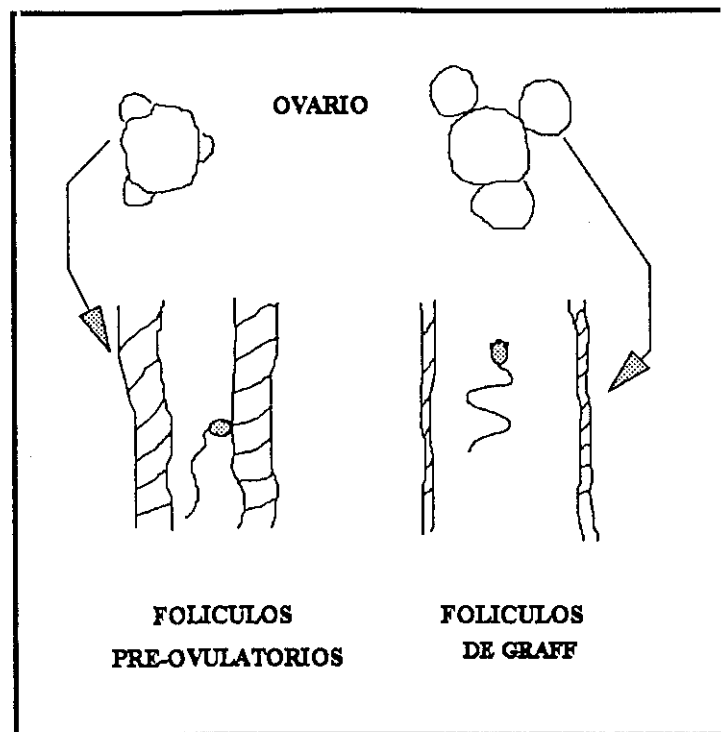


FIGURA 5: Representación esquemática del control ovárico del ascenso espermático en el oviducto (HUNTER et al., 1983).

2.4.1.2. Capacitación espermática y reacción acrosómica.

La capacitación consiste en una desestabilización de las membranas espermáticas que se produce durante el paso de los espermatozoides a través del aparato genital femenino. Los mecanismos moleculares de la capacitación han sido objeto de múltiples revisiones (Langlais y Roberts, 1985; Yanagimachi, 1988; Vázquez, 1991). La finalización de esta fase de maduración origina una vesiculación entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa llamada reacción acrosómica y un cambio en el patrón de movimiento espermático conocido como motilidad hiperactiva (Bedford, 1970, 1983). Todos estos acontecimientos resultan imprescindibles para que el espermatozoide pueda fusionarse con el ovocito.

La primera sugerencia que se dió para explicar la capacitación y su reversibilidad fué la pérdida de algunos componentes de superficie del espermatozoide (Chang, 1957). La eliminación de algunas glicoproteínas de superficie o de parte de ellas se ha considerado como uno de los acontecimientos fundamentales de la capacitación (Beared y Friend, 1982). Estas proteínas denominadas "factor de decapitación" o "factor estabilizador del acrosoma", se han

aislado tradicionalmente del plasma seminal, pero en los últimos años se ha evidenciado también su presencia en el fluido epididimal (Weinman y Willians, 1964), habiéndose demostrado posteriormente que este factor es secretado por las células del cuerpo del epidídimo (Thomas et al., 1984). El factor de decapacitación localizado libre en el plasma seminal puede decapacitar a espermatozoides capacitados (Oliphant et al., 1985), volviendo a adquirir éstos dicha propiedad cuando se les libera, por cualquier método, del plasma seminal (Carbonero y Vázquez, 1984). Previo a las modificaciones de las proteínas se produce la eliminación del colesterol de la membrana (Beared y Friend, 1982), ello origina una disminución de la relación colesterol/fosfolípidos de membrana (Langlais et al., 1981). La disminución de dicho cociente parece facilitar el influjo de calcio en el espermatozoide (Davis et al., 1979), desencadenando esta entrada de calcio al interior celular la reacción acrosómica (Roldan y Harrison, 1989). Esta reducción del colesterol no se produce por igual a lo largo de toda la membrana plasmática, sino que tan sólo afecta a determinadas zonas sobre la cabeza del espermatozoide (Langlais y Roberts, 1985).

La célula espermática para poder penetrar las envueltas que recubren al ovocito debe ir liberando el contenido del acrosoma durante la reacción acrosómica, proceso exocitótico que consiste en la formación de pequeñas vesículas mixtas, con eliminación de la matriz acrosomal y la exposición de la membrana acrosomal interna (Wassarman, 1987; Yanagimachi, 1988). La reacción acrosómica no se produce en todos los espermatozoides de forma simultánea. Existe una cadencia o presentación escalonada que permite aumentar las posibilidades de fertilización, siendo este fenómeno particularmente importante en las especies de ovulación inducida (Martínez et al., 1989).

La reacción acrosómica es un acontecimiento que se produce únicamente en espermatozoides capacitados (Yanagimachi, 1988), y con acrosoma intacto (Cherr et al., 1986), existiendo discrepancias en cuanto al lugar y naturaleza de los factores que la desencadenan (Meizel, 1985) (FIGURA 6).

Se ha observado este fenómeno en el lumen del oviducto (Yanagimachi, 1969; Hunter, 1990), en el "cumulus oophorus" (Cummins y Yanagimachi, 1986) y en la zona pelúcida (Wassarman, 1987). En la especie ovina, se ha descrito una hipótesis intermedia, según la cual la reacción acrosómica debe producirse en la matriz del "cumulus oophorus", uniéndose el espermatozoide a la zona pelúcida a partir del velo acrosomal formado tras la vesiculación de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Crozet y Dumont, 1984).

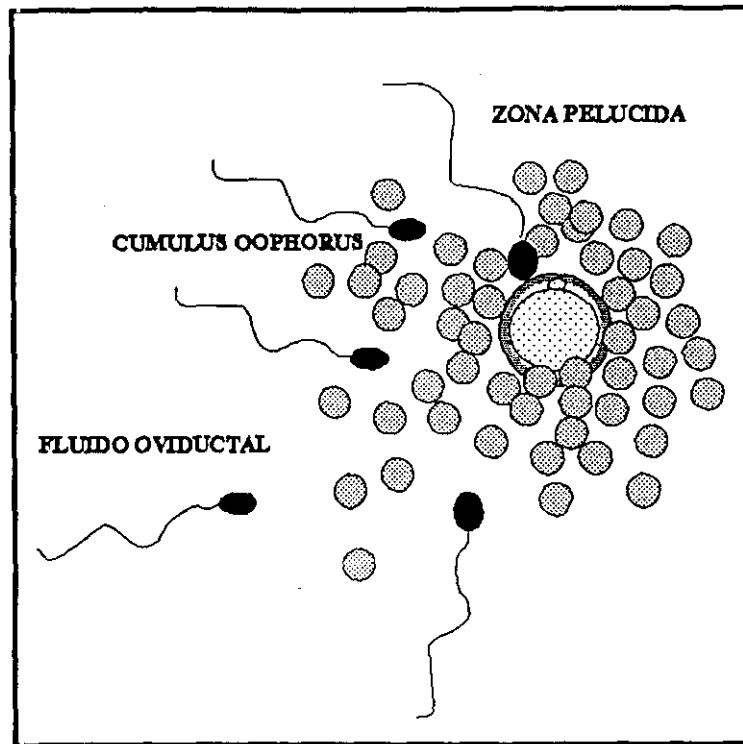


FIGURA 6: Lugares referidos como desencadenantes de la RA en espermatozoides de mamíferos (YANAGIMACHI, 1988).

Finalmente, los espermatozoides para poder penetrar las envueltas que recubren al ovocito adquieren una motilidad muy vigorosa, caracterizada por un gran aumento en la frecuencia y amplitud de movimiento del flagelo espermático (FIGURA 7). Esta hiperactivación proporciona a la célula espermática un gran empuje para su penetración a través de la zona pelúcida. Este evento ocurre antes de que tenga lugar la reacción acrosómica y ha sido referido en el ratón, conejo, perro, morueco, toro, cerdo y hombre (Yanagimachi, 1988).

2.4.2. Capacitación y reacción acrosómica "in vitro".

La FIV es una valiosa técnica reproductiva mediante la cual se ha obtenido descendencia viva al menos en veinte especies de mamíferos. En 1959, Chang consiguió los primeros conejos vivos procedentes de FIV, pero fue a finales de los años setenta cuando esta técnica significó un gran acontecimiento a nivel mundial, al nacer en Inglaterra en el año 1978 la primera "niña probeta" (Steptoe y Edwards, 1978). A pesar de estos éxitos, los métodos de FIV desarrollados han reportado unos resultados muy variables.

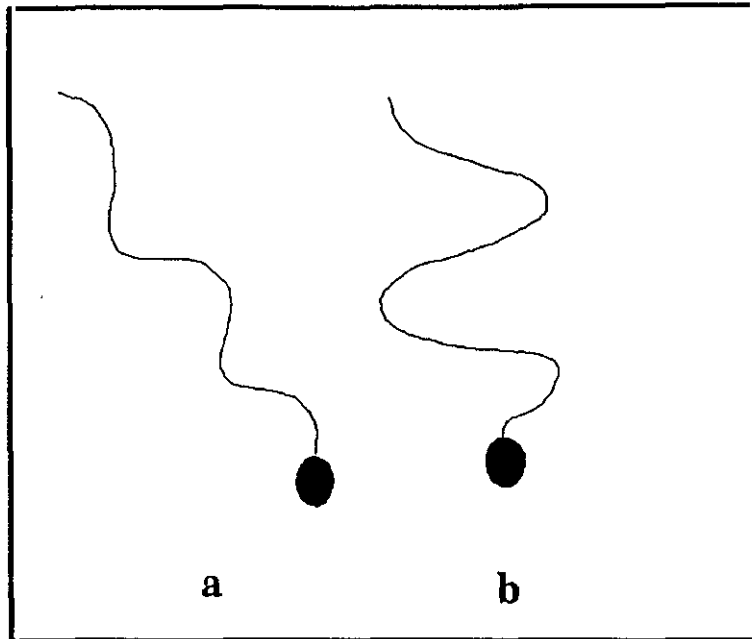


FIGURA 7: Cambios presentados en la motilidad espermática durante la capacitación. (a) Espermatozoide normal. (b) Espermatozoide hiperactivado.

Algunos autores han atribuido estos resultados a la existencia de ciertos factores que impiden la capacitación espermática. Los sistemas empleados en un principio para capacitar "in vitro" espermatozoides de rumiantes eran modificaciones de las técnicas empleadas para los roedores. Estos sistemas no aportan resultados plenamente satisfactorios, debido fundamentalmente a que los espermatozoos de roedor se obtienen de epidídimo, y por lo tanto, no contactan con los factores estabilizadores del acrosoma existentes en el plasma seminal; al contrario de lo que ocurre en rumiantes que los espermatozoides son eyaculados (First y Parrish, 1987; Yanagimachi, 1988). Por todo ello, se han empleado múltiples métodos para conseguir la capacitación "in vitro" de las células espermáticas de los rumiantes, obteniéndose resultados muy dispares. La revisión de estos trabajos nos ha permitido conocer los sistemas más empleados para este fin, de entre los cuales destacamos los siguientes:

- Incubación en medios químicamente definidos con alta fuerza iónica con objeto de desplazar el factor decapacitador, el cual actúa estabilizando el acrosoma (Bondioli y Wright, 1983).

- Cultivo de los espermatozoides durante amplios periodos de tiempo a temperaturas de +37°C ó +39°C en medios químicamente definidos, a fin de conseguir la disociación de las proteínas de superficie (Iritani y Niva, 1977; Wheler y Seidel, 1986).
- Inducción de la reacción acrosómica mediante el empleo del ionóforo de calcio A231087, el cual facilita la permeabilidad de las membranas hacia el calcio (Harrison y Roldan, 1990; Watson et al., 1991).
- Utilización de medios alcalinizados (pH: 7,8-8) para la preincubación espermática, mediante los cuales se eliminan las proteínas de superficie, se aumenta la entrada de calcio en las células y además se activan las fosfolipasas (Cheng et al., 1986; Fukui et al., 1988).
- Adición de diversas sustancias (catecolaminas, glicosaminoglicanos, y lisofosfatidilcolina) a los medios de cultivo para incrementar el grado de capacitación (Lenz et al., 1983; Parrish et al., 1985; First y Parrish, 1987; Lu y Gordon, 1988).

Los sistemas de capacitación "in vitro" para espermatozoides de morueco, no han aportado resultados completamente satisfactorios, si se comparan con los porcentajes de fertilidad obtenidos después de la capacitación de espermatozoos de otras especies (Bondioli y Wright, 1983). Este hecho podría deberse a la existencia de algún factor diferencial e inapreciable hasta el momento, que haga que la capacitación en el morueco sea diferente al mismo proceso en el conejo o en el toro (Thompson y Cummins, 1984). A pesar de ello, en 1986, Cheng et al. obtienen un porcentaje de penetración del 80%, al preincubar semen de morueco en un medio alcalinizado (pH: 7,8), ello hace que la fertilización "in vitro" en ganado ovino tenga un futuro mucho más alentador.

Además de la composición y del tipo de medio empleado para la preincubación de las células espermáticas, existen otros factores que intervienen en el proceso de la capacitación y reacción acrosómica "in vitro" en espermatozoides de morueco, entre los cuales se han referido los siguientes: procedencia de los espermatozoos, concentración espermática durante la preincubación, tiempo de preincubación, temperatura, pH y suplementación del medio (Paulok, 1981; Go y Wolf, 1985; Graham et al., 1991; Thompson y Cummins, 1984; Cheng et al., 1986).

2.4.3. Técnicas laboratoriales de valoración de capacitación y reacción acrosómica.

Los resultados obtenidos de los sistemas de FIV deben ser analizados cuidadosamente, al menos en lo referente a la capacitación espermática, ya que, aunque la existencia de elevados porcentajes de penetración indica obligatoriamente que la capacitación se ha efectuado correctamente, cuando la FIV no es adecuada no necesariamente debe atribuirse a un fallo en el sistema de capacitación (Yanagimachi, 1988). Por ello, resulta esencial conocer en todo momento el estado espermático antes y durante el cocultivo. Se han descrito numerosas técnicas para poder determinar cuándo un espermatozoide sufre la capacitación y la RA, estando todas ellas basadas en la identificación de los cambios que sufren las células espermáticas durante estos acontecimientos (Martínez et al., 1989).

2.4.3.1. Técnicas de tinción.

El empleo de técnicas de tinción para valorar la morfología acrosómica ha sido referido por numerosos autores (Casarrett, 1953; Saacke y Marshall, 1968; Watson, 1975a; Bamba, 1988). Estas técnicas no pueden determinar la viabilidad espermática, con lo que no se puede identificar si la reacción acrosómica es fisiológica o degenerativa, cosistiendo la primera en una vesiculación progresiva entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa originada por la capacitación, y la segunda en un proceso degenerativo evidenciado en espermatozoides inmóviles como consecuencia de la muerte celular (Bedford, 1970).

En 1981, Talbot y Chacon describen una técnica de triple tinción (TST) desarrollada para espermatozoides humanos, que permite distinguir entre ambas reacciones acrosómicas mediante el empleo de azul Tripán, marrón Bismark y rosa Bengala. Esta técnica ha sido utilizada bajo distintas condiciones en espermatozoides humanos (Talbot y Chacon, 1981), de roedores (Dudenhausen y Talbot, 1982), de équidos (Varner et al., 1987), de bóvidos (Didion y Graves, 1986), de caprinos (Kusunoki et al., 1987), de ovinos (Garde et al., 1992) y de porcinos (Vázquez, 1991).

En algunas especies, los resultados obtenidos con la TST se han contrastado con estudios de microscopía electrónica de transmisión, valoración vital y microscopía de contraste de fase (Dudenhausen y Talbot, 1982; Didion y Graves,

1986; Vázquez, 1991; Garde et al., 1992), habiéndose encontrado altas correlaciones entre las mencionadas valoraciones y la TST.

La TST además de ser una técnica de un valor indudable en los estudios de FIV puede emplearse para evaluar la viabilidad y la integridad acrosómica de espermatozoides sometidos a distintos procesos de conservación.

2.4.3.2. Sistemas de FIV.

Al contrario de lo que sucede con el ovocito, que es capaz de ser fertilizado en el momento de la ovulación, la célula espermática debe sufrir el proceso de la capacitación después de la eyaculación y antes de la fertilización.

Sólamente aquellos espermatozoides que cumplen estos requisitos pueden interaccionar con los ovocitos, penetrarlos y transformarse en los correspondientes pronúcleos masculinos. Por lo tanto, estas pruebas son útiles para definir las condiciones que llevan al espermatozoide a la capacitación y RA.

Los sistemas de FIV homólogos han sido empleados con diversos fines, así se han utilizado para el estudio de los mecanismos fisiológicos que intervienen en la fecundación y para determinar las condiciones que llevan a los espermatozoides a experimentar la capacitación y la RA (Dodds y Seidel, 1984; Biottner et al., 1990). Estos sistemas presentan el inconveniente de necesitar ovocitos maduros para su realización, por lo que su utilización no está siendo muy generalizada (Martínez et al., 1989).

Desde que Yanagimachi et al., en el año 1976 informaron que los ovocitos desnudos de hámster dorado podían ser penetrados por espermatozoides humanos capacitados, esta prueba ha sido adaptada a otras especies con diversos objetivos, habiéndose utilizado para evaluar el éxito de los sistemas de capacitación "in vitro" (Schellander et al., 1989; Graham et al., 1991).

2.4.3.3. Otras pruebas.

Se han desarrollado otras técnicas laborales para determinar la capacitación y la RA (Jones, 1973; Aalseth y Saacke, 1986; Moore et al., 1987; Berger, 1990). Estas técnicas no son muy aceptadas, ya que presentan ciertos

inconvenientes, como son, el no poder diferenciar la verdadera reacción acrosómica de la falsa, el necesitar un aparataje poco accesible para su desarrollo y el requerir amplios periodos de tiempo para su realización (Cross y Meizel, 1989).

2.5. FERTILIDAD CON SEMEN CONGELADO.

Los resultados de fertilidad se encuentran intimamente relacionados por un lado con las características del macho y por otro, con las condiciones fisiológicas de las hembras que se inseminan. Además, cuando se aplica la inseminación artificial, debemos mencionar otros elementos, dependientes de la propia técnica que también van a afectar los índices de fertilidad obtenidos. La bibliografía revisada, destaca entre estos factores los siguientes:

- Calidad inicial del semen
- Tratamiento del semen
- Lugar de deposición
- Número de espermatozoides
- Sincronización e inducción al celo
- Momento de la inseminación

2.5.1. Calidad inicial del semen

Resulta difícil poder establecer "in vitro" la calidad inicial de una dosis seminal, ya que hasta el momento las pruebas empleadas para ello, son incapaces de predecir de una forma fiable y precisa la capacidad fecundante de la muestra en cuestión. No obstante, se ha observado que las características iniciales del eyaculado influyen sobre las tasas de gestación obtenidas del mismo. Esta calidad inicial depende de diversos factores, entre los cuales se han enunciado la edad, raza, época del año e individuo (Colas, 1981; Vijil, 1986; Folch, 1987) (El efecto de la edad y la raza de los sementales sobre la calidad seminal, ya ha sido enunciado en el apartado 2.1.). De igual modo, se han observado variaciones en fertilidad y calidad seminal debidas a la estacionalidad reproductiva del ganado ovino. Así, en la raza Ilê de France, se ha observado un mayor porcentaje de formas anormales en los meses de Enero-Junio, coincidiendo con una fuerte bajada de la fertilidad que decrece del 68,4% en otoño, hasta el 47,1% de esta época (Colás, 1981). Este descenso de fertilidad en primavera se registra también para la raza Churra (Olmedo, 1988).

Pérez García et al. (1987), sostienen que en la raza Manchega, los moruecos mantienen a lo largo de todo el año un comportamiento copulatorio y unas características seminales compatibles con un nivel reproductivo normal. A pesar de ello, se evidencia una variación estacional en tales parámetros, de tal manera que los mínimos se producirían en primavera, con una elevación sustancial en el resto del año. Sin embargo, esta diferencia no tiene reflejo, estadísticamente significativo, en los niveles de fertilidad obtenidos mediante inseminación artificial.

Junto a los efectos ambientales existen otros inherentes al propio semental capaces de influir no sólo sobre las características seminales sino, también, sobre la fertilidad (**Pérez García et al., 1987**). En este sentido se han reflejado diferencias significativas de fertilidad entre moruecos empleando semen refrigerado (**Pérez García et al., 1987**) y congelado (**Maxwell, 1986**).

2.5.2. Tratamiento del semen

Los resultados obtenidos de la aplicación de dosis seminales por medio de la inseminación artificial, se ven afectados por el tratamiento al cual se someta al semen (**Lightfoot y Salamon, 1970**). Los bajos resultados de fertilidad obtenidos después de la inseminación con semen congelado están relacionados con la reducida tasa de recuperación espermática que se consigue tras el proceso de congelación-descongelación (**Saacke, 1982**). La fertilidad con semen congelado es de un 20 a un 25% inferior que con semen refrigerado (**Colas, 1975; Gustafson, 1978; Fiser et al., 1987**). Resultados similares se han referido para la raza Latxa, en la cual las tasas de gestación obtenidas tras la inseminación con semen congelado (32%) se sitúan un 18% por debajo de las aportadas al aplicar dosis refrigeradas (**Beltran de Heredia et al., 1989**). En otras experiencias realizadas por **Abdelhakeam (1988)**, estas diferencias de fertilidad entre semen congelado (33%) y refrigerado (83%) son del 50% en algunos casos. **Dziuk et al., (1972)** indican que la simple manipulación del semen en los programas de inseminación artificial reduce la fertilidad en un 21%, atribuyendo, por tanto, parte de los fracasos obtenidos al aplicar dicha técnica a este hecho.

2.5.3. Lugar de deposición del semen.

Las tasas de gestación derivadas del empleo de semen congelado por vía cervical son generalmente pobres. Este problema se asocia, por un lado, con la

dificultad que se presenta para atravesar el cervix de la oveja y depositar los espermatozoides en el útero por vía transcervical (**Mattner et al., 1969; Lightfoot y Salamon, 1970**); y por otro, la reducida viabilidad de espermatozoides en el tracto genital femenino (**Hawk y Conley, 1975**). Por ello, los índices reproductivos han sido siempre superiores cuando se ha realizado la deposición del semen congelado en el útero.

Así, **Graham et al. (1978)** encuentran diferencias estadísticamente significativas en fertilidad en función del lugar donde se deposita el semen, siendo del 31,3% cuando se hace en la entrada del canal cervical, de 59,6% cuando este hecho ocurre en la porción media de dicho conducto y del 73,5% cuando el semen es alojado en el útero por vía transcervical.

Killen y Moore (1970), utilizando la vía quirúrgica, demostraron que con la inseminación por vía intrauterina, se conseguían porcentajes de gestación mucho más elevados que utilizando la vía cervical, sin embargo, la completa estructura anatómica del cervix ovino, dificulta enormemente la deposición transcervical en el útero.

Las técnicas laparoscópicas, han permitido grandes avances en la observación y manipulación del tracto genital siendo una de sus mayores aplicaciones la posibilidad de inseminación intrauterina por vía no quirúrgica (**Killen y Caffrey, 1982**), la cual permite realizar la inseminación en un punto más cercano al de fertilización utilizando un menor número de espermatozoides y una mayor amplitud en el periodo fértil de la inseminación en animales con celo sincronizado. Empleando esta técnica se obtienen fertilidades muy superiores a cuando se deposita el semen congelado por vía cervical: 80% versus 54% (**Vallet et al., 1988**). Finalmente, se ha enunciado que el empleo de esta técnica utilizando semen congelado se obtienen fertilidades muy próximas ó incluso superiores a las reflejadas cuando se aplica semen refrigerado por vía cervical (**Beltran de Heredia et al., 1989; López Sebastián, 1992; Anel et al., 1992**).

Esta técnica a pesar de no suponer una solución definitiva al problema de la inseminación artificial ovina con semen congelado, por su relativa complejidad, permite la utilización del semen congelado con buenos resultados de fertilidad hasta que investigaciones posteriores permitan su utilización por vía vaginal con resultados aceptables.

2.5.4. Concentración espermática.

La Inseminación artificial ovina no se ha desarrollado en la especie ovina al igual que en otras especies domésticas y ello se debe, entre otras causas, al bajo número de dosis que se obtienen por eyaculado por el alto número de espermatozoides necesarios. El número de dosis está influenciado por el tratamiento del semen y por el lugar de deposición del mismo (Evans y Maxwell, 1989). Para la inseminación cervical de la oveja el número de células espermáticas requerido cuando se emplea semen fresco oscila de $100-200 \times 10^6$ espermatozoides (Langford y Marcus, 1982), recomendándose dosis más elevadas cuando se practica una única inseminación por vía cervical. En general, nunca debe aplicarse menos de 100×10^6 para ovejas sincronizadas con tratamientos progestativos. Cuando el semen es congelado, el mínimo número de espermatozoides móviles que debe introducirse en ambos casos ha de estar por encima de los 400×10^6 espermatozoides/oveja. Colas (1979), no encuentra diferencias significativas en fertilidad cuando insemina con $500-400-300 \times 10^6$ espermatozoides/0,25 ml. por vía vaginal, siempre que el semen se mantenga refrigerado a $+15^\circ\text{C}$ menos de 5 horas.

Visser y Salomon (1974), establecen que la fertilidad con semen congelado-descongelado se incrementa al aumentar el número de espermatozoides móviles por dosis (TABLA 1).

Langford y Marcus (1982) no encontraron diferencias significativas en fertilidad, al aplicar semen congelado por vía cervical con dosis de 200 y 400×10^6 espermatozoides/0,25 ml. Cuando utilizaron dosis espermáticas inferiores a los 100×10^6 /0,25 ml. la fertilidad disminuyó marcadamente.

TABLA 1: Fertilidad con semen congelado en relación con el número de espermatozoides móviles aplicados.

Nº espermatozoides móviles por I.A. ($\times 10^6$)	Nº ovejas inseminadas	Nº ovejas paridas (%)
90	75	19 (25,3)
180	69	25 (36,2)
360	66	37 (56,1)

El uso cada vez más frecuente de la laparoscopia para la inseminación artificial intrauterina, ha permitido reducir notablemente el número de espermatozoides necesarios por dosis. Maxwell (1986), obtiene mejores resultados de fertilidad, utilizando semen congelado por vía intrauterina con una dosis de espermatozoides 10 veces inferior a la utilizada con semen refrigerado por vía cervical. Davis et al., (1984) no encuentran diferencias en las tasas de gestación al utilizar dosis congeladas de 100 ó 10×10^6 de espermatozoides.

2.5.5. Sincronización e inducción del celo.

El hecho de que en los países mediterráneos, la técnica de inseminación se desarrolle unida a la sincronización previa de celos, limita aún más los resultados obtenidos de la misma, por un lado debido al porcentaje de ovejas que no responden al tratamiento o que no presentan la ovulación sincronizada con el resto; y por otro a la alteración del transporte espermático provocado por los progestágenos (Quinlivan y Robinson, 1967). A pesar de ello, este tipo de tratamientos permite el uso de la inseminación artificial sistemática en cualquier época del año y sin detección previa de celos. Los métodos empleados están basados en tratamiento farmacológicos o de manejo, tales como el efecto macho o la sobrealimentación (Robinson, 1967; Pérez García, 1989; Folch, 1990).

La administración de progesterona o progestógenos como bloqueadores del ciclo sexual combinado con la acción estimulante de la PMSG (gonadotropina sérica de yegua gestante) (Robinson, 1967), constituye uno de los tratamientos que mayores avances ha aportado en el control reproductivo del ganado ovino, consiguiendo la inducción de la ovulación con un alto grado de sincronización.

Algunos autores han empleado derivados sintéticos de las protanglandinas $F2_{\alpha}$, que debido a su acción luteínica van a producir la regresión del cuerpo lúteo en los animales tratados, estableciéndose posteriormente en ellos (de forma simultánea) un nuevo desarrollo folicular y ovulación. Este tratamiento presenta el inconveniente de poder provocar la regresión temprana de los cuerpos lúteos formados, debido a la larga vida media de la $PGF2_{\alpha}$ en sangre, disminuyendo por tanto las tasas de fertilidad (Shciewe et al., 1990) obtenidas al aplicar estos tratamientos de control de ciclo estral, han sido siempre inferiores a cuando los animales se inseminaron con celo natural (Trejo et al., 1984).

La regulación del ciclo estral en ovejas por el uso de progestágenos o

prostaglandina $F2_{\alpha}$, impide el ascenso espermático a través del cervix reduciendo el número de espermatozoides presentes en el oviducto en los momentos próximos a la ovulación, alterando por tanto, la fertilización (Quinlivan y Robinson, 1969; Allison y Robinson, 1970). Estos tratamientos incrementan el número de espermatozoides muertos o dañados en su membrana en el cervix y lumen uterino (Hawk et al., 1987).

2.5.6. Momento de la inseminación.

La ovulación, en la oveja, tiene lugar aproximadamente entre las 24 y las 27 horas de la aparición del celo, por tanto, la oveja debe ser inseminada entre 16 y 26 horas a partir del comienzo del estro para conseguir la máxima fertilidad (Cole y Cupps, 1984).

Por otro lado, las hembras sincronizadas con progestágenos y PMSG, presentan la descarga de LH entre las 38 y 42 horas de la retirada del tratamiento (Cognie y Pelletier, 1976), existiendo un intervalo constante de 21-26 horas entre dicha descarga de LH y la ovulación (Cumming et al., 1971), presentándose por tanto ésta entre las 60 y 68 horas de la retirada de la esponja (López Sebastián, 1991). Si a esto se une un periodo de capacitación del espermatozoide de aproximadamente dos horas (Hunter, 1991), parece lógico que los mejores resultados con inseminación artificial se obtengan en torno a las 55 y 60 horas de retirar la esponja para la inseminación cervical e intrauterina respectivamente (Maxwell, 1986; Gabiña y Folch, 1987; Olmedo, 1988; López Sebastián, 1991).

3. MATERIAL Y METODO

3. MATERIAL Y METODO.

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material Biológico

3.1.1.1. Machos Reproductores

El Departamento de Producción Animal del CIT/INIA de Madrid tiene en propiedad un rebaño de 20 moruecos manchegos, ubicados en la sede del Area de Reproducción, de los cuales se eligieron al azar 5 sementales para llevar a cabo la experiencia 1 del presente estudio.

Para el desarrollo de las experiencias 2 y 3 se emplearon 5 machos escogidos aleatoriamente de entre los 140 pertenecientes actualmente al Esquema de Selección de la raza ovina Manchega. Este lote se encuentra ubicado en el Centro Regional de Selección y Reproducción Animal (C.E.R.S.Y.R.A.) de Valdepeñas, Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Ciudad Real).

Los dos grupos de animales se mantuvieron bajo condiciones de manejo y alimentación similares. La edad de todos los sementales estaba entre los 4 y 5 años, y el peso entre los 90 y 115 Kg. La alimentación consistió en pienso concentrado (aproximadamente 1,5 Kg/animal/día) y la correspondiente ración de volumen a base de heno de alfalfa y paja de cereales (1 Kg/animal/día), y bloques minerales a libre disposición.

En los dos rebaños referidos se efectúan los controles y programas sanitarios de acuerdo con la legislación vigente para la especie ovina.

3.1.1.2. Hembras Inseminadas.

Para completar las experiencias 2 y 3 se emplearon un total de 150 ovejas Manchegas escogidas al azar de entre las 650 que componen el rebaño experimental existente en el CERSYRA. Se eliminaron cuatro, por diversos motivos, antes de finalizar las experiencias.

Las hembras, cuyas edades oscilan entre los 2 y los 9 años, fueron manejadas y alimentadas siguiendo el esquema tradicional usado en la raza Manchega. La

condición corporal media en el momento de la inseminación artificial es de $2,65 \pm 0,041$. El intervalo parto-inseminación previo al experimento fué, en todas las ovejas, superior a 90 días.

3.1.1.3. Hámster.

Para el desarrollo de la prueba de penetración espermática se utilizaron hembras adultas nulíparas de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), de edades comprendidas entre los 2 y 4 meses, y pesos de 50 y 70 g.

Las hembras se alojaron en jaulas de poliestireno (30x50x15 cm) en un recinto con ambiente controlado: 14 horas de luz (9.00 a 23.00), temperatura de +20 a +25°C, humedad relativa del 55% y de 10-15 renovaciones de aire/hora. La alimentación consistía en pienso comercial para ratones y aporte diario de alimentos frescos como fuente extraorgánica de vitaminas.

3.1.2. Material empleado en la recogida y conservación del semen.

- Caja de transporte.
- Vagina artificial de ovino-caprino Mod. I.M.V.
- Colectores del cristal graduados en 0,1 ml. (10 ml.).
- Intermediarios Mod. I.M.V.
- Funda protectora.
- Potro de sujección de hembra
- Vitrina de refrigeración (I.M.V.)
- Pajuelas de 0,50 ml. mod. I.M.V. AA 101.
- Bloque de Distribución de pajuelas GB 005 mod. I.M.V.
- Rampa J 002 mod. I.M.V.
- Barqueta GC 000 mod. I.M.V.
- Soporte de barqueta GC 003 mod. I.M.V.
- Peines de aspiración B 103 mod. I.M.V.
- Visotubos para la distribución de pajuelas PA 003 mod. I.M.V.
- Recipiente criogénico CG-40 27690
- Rejilla soporte mod. I.M.V.
- Tanque criogénico de almacenamiento de pajuelas mod. 21 HCL Taylor & Wharton.
- Estufa de 15°C (Selecta).

3.1.3. Material general de laboratorio.

- Equipo purificador de agua por ósmosis inversa Millipore (Mill-Ro4).
- Osmómetro Advanced mod. 3 Mo.
- Peachímetro Crison mod. microph 2001
- Centrífuga Wifug
- Agitador magnético Agimatic-N
- Pipeta automática Gilson 1000 µl. graduable de 10 µl.
- Balanza de precisión Sauter
- Spectronic 20 (Bausch & Lomb)
- Placa calefactora rectangular (Minitüb) mod. HT 400
- Microscopio óptico y de contraste de fases Nikon mod. Labophot.
- Monitor TV mod. CWM 194 Sony Cop.
- Estufa de desecación y esterilización TD
- Bañomaria "Precistern"
- Cronómetro digital
- Material fungible de laboratorio: pipetas pasteur, vasos de precipitado, probetas, matraces aforados, termómetros, portaobjetos, cubreobjetos, viales, gradillas...

3.1.4. Material de laboratorio específico para el sistema de FIV.

- Microscopio invertido mod. TMS (Nikon)
- Estereomicroscopio mod. EMZ-2 (MEIJI)
- Centrífuga Heraeus mod. Labofuge Ae
- Incubadores de CO₂ mod. 6100-01 (Nafco)
- Cámara de flujo laminar horizontal Telstar mod. AV-100
- Placas de petri de 35x10 mm. de ϕ (Nunc) (Nunc)
- Filtros de acetato de celulosa de 0,80 y 0,22 µm Millex-AA (Millipore).
- Micropipetas automáticas Gilson de 20 y 100 µl graduables

Todo el material fungible de laboratorio empleado para el sistema de FIV se encontraba en condiciones estériles.

3.1.5. Material empleado para la obtención de ovocitos de hámster.

3.1.5.1. Hormonas

- PMSG (Foligón. Lab. Intervet).
- HCG (Coriogán. Lab. ovejero).

3.1.5.2. Material quirúrgico

- Éter etílico nº 211313 (Quimon)
- Material de disección perteneciente a la microcirugía de otras disciplinas (oftalmología):
 - 2 pinzas de Dumont, rectas del nº 3 y 4.
 - Tijeras de punta fina y afilada
- Pocillos de recogida (Pobel)
- Jeringas de insulina (ICO steril. 1CC).

3.1.6. Material empleado en la Inseminación Artificial Ovina.

- Esponjas intravaginales de 30 mg. de FGA (Acetato de Fluorogestona de lab. Intervet).
- Aplicador esponjas.
- PMSG (Foligón. Lab. Intervet)
- Espéculo vaginal VA 045 mod. IMV.
- Fuente de luz para el espéculo VA 062 mod. IMV
- Lubricante estéril para el espéculo
- Inyector para pajuelas de 0,50 ml. VA 005 mod. IMV
- Vainas protectoras UA 106 mod. IMV
- Caja de transporte de semen de temperatura regulable electrónicamente (Rheinttechnik).
- Ampollas de ácido acético glacial.

3.1.7. Reactivos empleados para la conservación del semen.

3.1.7.1. Refrigeración

- Leche descremada en polvo (Regilait)
- Citrato trisódico dihidratado n° 6448 (Merck).
- Penicilina-G sódica n° P-3032 (Sigma).
- Sulfato de dihidroestreptomicina n° 753483 (CEPA).

3.1.7.2. Congelación.

- TRIS (N-Tris (hidroximetil) aminometano n° T-1378 (Sigma)
- Fructosa D(+) n° 5323 (Merck)
- Acido Cítrico n° 244 (Merck)
- Dextrano B (pm: 100.000 - 200.000) n° 18693 (Serva).
- Citrato trisódico dihidratado n° 6448 (Merck).
- TES (N-Tris [hidroximetil] Metil-2 ácido aminoetano sulfónico.) n° T-1375 (Sigma).
- Glicina n° 4201 (Merck)
- Lactosa n° 7657 (Merck)
- Rafinosa n° 7549 (Merck)
- Glicerol (d 1'26) n° 24387.29 (Rhône-Poulenc).
- Penicilina-G sódica n° P-3032 (Sigma).
- Sulfato de dihidroestreptomicina n° 753483 (Cepa).
- Alcohol de polivinilo n° P-8136 (Sigma).

3.1.8. Reactivos para el sistema de FIV.

- ClNa n° 141659 (Panreac)
- ClK n° 4936 (Merck)
- $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ n° 2382 (Merck)
- PO_4KH_2 n° 4873 (Merck)
- $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ n° 5886 (Merck)
- Piruvato de sodio n° 6619 (Merck)
- CO_3HNa n° 6329 (Merck)
- Lactato de Sodio n° L-4263 (Sigma)
- Glucosa anhidra n° 8337 (Merck)

- BSA fracción V n° A-9647 (Sigma)
- Pu-G sódica P-3032 (Sigma)
- Sulfato de dihidroestreptomicina n° 753483 (Cepa)
- HPO_4Na_2 n° 6586 (Merck)
- $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ n° 5833 (Merck)
- Rojo fenol n° P-5530 (Sigma)
- Hialuronidasa n° H-3506 (Sigma)
- Tripsina n° 0152-15-9 (Difco)

3.1.9. Reactivos utilizados en la T.S.T.

- Trizma base n° T-1503 (Sigma)
- Acido cacodílico n° C-0250 (Sigma)
- Azul Tripán n° 11732 (Merck)
- Marrón Bismarck Y n° B 5263 (Sigma)
- Rosa Bengala R-3877 (Sigma)
- Glutaraldehido al 25% n° 23114 (Serva)
- Permunt n° 1993 (Ficher scientific).

3.1.10. Otros reactivos

- Glutaraldehido al 25% n° 4239 (Merck)
- Citrato sódico $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ n° 6448 (Merck)
- Alcohol 100% (Panreac) n° 212800
- Agua bidestilada desionizada y purificada
- Vaselina (Probus)
- Parafina 57-60 °C
- ClH 1N
- HONa 1N
- Suero salino fisiológico
- Aceite de parafina viscosidad 125/135 (Ficher scientific).

3.2. METODO

Las pruebas de laboratorio se han realizado en el Departamento de Producción Animal del CIT/INIA de Madrid y en el C.E.R.S.Y.R.A. de Valdepeñas, Organismo dependiente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Efectuándose el ensayo de fertilidad en el rebaño existente en la finca experimental "La Nava" (Valdepeñas).

3.2.1. Diseño Experimental

El trabajo experimental fué planificado en tres fases, constituyendo cada una de ellas experiencias consecutivas en el periodo de tiempo citado.

3.2.1.1. Experiencia 1: Análisis del efecto ejercido por los procesos de congelación sobre la función espermática "in vitro".

En esta experiencia estudiamos la acción ejercida por el método de conservación del semen y la temperatura de preincubación del mismo sobre la fisiología espermática "in vitro".

Empleamos muestras de semen heterospérmico de 5 machos. Una vez obtenidos y contrastados los eyaculados, se procede a la mezcla y homogenización de los mismos. La suspensión espermática resultante fué diluída a +30°C en el primer diluyente y enfriada a -0,22°C/min hasta +5°C. Posteriormente se diluyó con el diluyente glicerolado y se mantuvo durante dos horas a dicha temperatura. Trás este periodo la muestra seminal fué dividida en dos aliquotas, congelándose la primera según se detalla en el apartado 3.2.2.1.1 de esta tesis y preincubándose la segunda tras dos lavados y un proceso de swim-up, durante 24 h. a +37 y +39°C. A diferentes tiempos desde el comienzo de la preincubación se analizó la motilidad, viabilidad, integridad de membrana, R.A. y porcentaje de penetración de ovocitos de hámster. La primera aliquota una vez descongelada fué tratada de igual forma que la segunda.

La experiencia se realizó por quintuplicado, contándose en cada prueba para cada tratamiento del semen, periodo de incubación y temperatura:

- Test de hámster: 15 ovocitos
- Reacción Acrosómica y viabilidad (por TST): 300 espermatozoides.
- Endósmosis positiva: 100 espermatozoides.

3.2.1.2. Experiencia nº 2: Incidencia del factor individual sobre la reacción acrosómica "in vitro" del semen congelado de morueco. Efectos sobre fertilidad.

Para estudiar la incidencia del factor individual sobre la reacción acrosómica "in vitro" en el semen congelado de morueco hemos realizado esta experiencia, en la cual hemos analizado la evolución en el tiempo del porcentaje de reacción acrosómica en los distintos sementales utilizados, así como las repercusiones de estas variaciones individuales en la fertilidad "in vitro" e "in vivo". Para ello se preincubó el semen de los cinco moruecos durante 24 horas a +39°C, determinándose a intervalos de 3 horas, el porcentaje de R.A. por medio de la TST. Para completar esta experiencia se realizó un test de hámster tras un periodo de preincubación del semen de 4,5 horas, con objeto de evaluar la influencia de la cinética de presentación de R.A. sobre las tasas de fertilidad "in vitro".

Para realizar esta experiencia se ha repetido cinco veces el sistema de preincubación del semen elegido, contándose 300 espermatozoides en cada prueba para cada periodo de preincubación y semental estudiado ($300 \times 5 \times 6 \times 5 = 45.000$ espermatozoides). En la realización del SPA se evaluaron 40 ovocitos por semental y repetición ($40 \times 5 \times 5 = 1.000$ ovocitos).

Además se inseminaron 150 ovejas Manchegas con semen congelado distribuidas en cinco lotes (lote/morueco) homogéneos de 30 ovejas cada uno, con objeto de poder estimar en qué medida la cinética que sigue la reacción acrosómica "in vitro" en cada morueco, influye sobre los resultados de fertilidad obtenidos.

3.2.1.3. Experiencia 3: Correlaciones entre analítica de laboratorio y pruebas de fertilidad.

Esta experiencia se ha desarrollado para estimar "in vitro" el poder fecundante del semen de morueco congelado. En ella se contrastaron los resultados obtenidos de la inseminación artificial y del test de hámster descritos en la experiencia n° 2, con las siguientes pruebas realizadas en el laboratorio a las 0, 6 y 24 horas de descongelar las dosis:

- Porcentaje de motilidad (FMP)
- Calidad de movimiento (FMR)
- Porcentaje de acrosomas intactos (PIA)
- Porcentaje de endósmosis positiva (E+)
- Porcentaje de motilidad tras la incubación de la muestra durante una hora a +39°C (FMP 60)

Las pruebas "in vitro" se realizaron por quintuplicado, utilizándose en cada repetición dos dosis del mismo semental; evaluándose durante el análisis cuantitativo 200 espermatozoides y 40 ovocitos de hámster en el SPA para cada determinación.

3.2.2. Metodología.

3.2.2.1. Obtención y contrastación inicial de semen.

El semen fué obtenido mediante el método de la vagina artificial siguiendo las indicaciones de **Evans y Maxwell (1989)**. Los moruecos se sometieron a un régimen sexual de una recogida semanal, obteniéndose dos eyaculados en cada sesión.

Tras la recogida, los eyaculados fueron transportados al laboratorio en condiciones isoterma (+35 a +37°C), determinándose, volumen eyaculado en ml., concentración espermática ($\times 10^6/\text{ml}$), motilidad masal (MM), motilidad individual (MI), test de endósmosis positiva (E+), morfoanomalías e integridad acrosómica.

El volumen se evaluó directamente, mediante apreciación visual en el colector graduado. La concentración espermática se determinó por espectrofotometría. La motilidad masal se estimó microscópicamente apreciando la calidad e intensidad de las ondas producidas por la masa espermática en movimiento. Este parámetro se

valoró en una escala de 0 a 5 siguiendo la clasificación de **Evans y Maxwell (1989)**. Para establecer el grado de morfoanomalías, las muestras fueron incluídas en una solución de glutaraldehído y analizadas posteriormente por microscopía de contraste de fases expresándose en porcentaje el número de espermatozoides morfológicamente normales. El resto de parámetros se evaluó siguiendo los protocolos establecidos en el apartado 3.2.2.2.3. de esta tesis.

Al concluir la valoración inicial se eliminaron todos los eyaculados que no cumplieron las siguientes condiciones:

- Volumen igual o superior a 0,4 ml.
- Concentración superior a 3000×10^6 espz/ml.
- M.M. superior a 4,5
- M.I. superior a 80%
- Formas normales superiores al 85%
- Acrosomas normales superiores al 80%.
- Grado de E+ superior al 80%.

3.2.2.2. Conservación del semen.

Teniendo en cuenta la metodología descrita por **Fiser et al. (1987)** para la crioconservación del semen de morueco, se ha utilizado el siguiente modelo:

3.2.2.2.1. Tratamiento del semen

3.2.2.2.1.1. Para su congelación

Las muestras seminales se diluyen inicialmente a $+30^{\circ}\text{C}$ hasta una concentración espermática de $1,5 \times 10^9$ espz/ml. en condiciones isotermas, con un diluyente tris-fructosa modificado conteniendo un 25% (V:V) de yema de huevo. (Tabla 2: Diluyente 1). Esta suspensión espermática se refrigera hasta la temperatura de $+5^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de enfriamiento de $-0,22^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Una vez alcanzados los $+5^{\circ}\text{C}$ se añade el diluyente glicerolado (Tabla 2: Diluyente 2) 1:2 (V:V), manteniéndose durante 2 horas a esta temperatura para su equilibración. Con ello se consiguió introducir 500×10^6 espz/pajuela totales. Por último se procedió al envasado de las dosis en pajuelas de 0,5 ml. y a su congelación en un tanque

criogénico CD-40, donde las dosis se colocaron horizontalmente en una gradilla situada en vapores a 5 cm. sobre el nivel de nitrógeno líquido. El tiempo de exposición a los vapores de nitrógeno líquido fué de 10 min. y posteriormente se almacenaron hasta su utilización después de una semana como mínimo desde el momento de la congelación.

3.2.2.2.1.2. Para su refrigeración

El semen fué diluído en un tercer diluyente a base de leche descremada (Tabla 2: Diluyente 3) para su utilización en la inseminación artificial con semen refrigerado y para la contrastación del semen congelado.

Para la inseminación artificial los eyaculados se diluyen a $+30^{\circ}\text{C}$ hasta una concentración de 1000×10^6 espz/ml., refrigerándose progresivamente hasta los $+15^{\circ}\text{C}$, manteniéndose a esta temperatura durante dos horas hasta el momento de la inseminación artificial.

En la contrastación de las dosis congeladas - descongeladas, éstas se rediluyen con cinco partes de este tercer diluyente (V:V) a temperatura ambiente después de haber realizado la contrastación post-descongelación a las 0 horas y se mantienen a $+15^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas para realizar las evaluaciones correspondientes según el diseño experimental, a las 6 y 24 horas post-descongelación.

3.2.2.2.2. Diluyentes empleados.

La composición de los diluyentes de congelación y refrigeración se refleja en la **TABLA 2**.

Para la preparación del diluyente 1 se añadieron, por orden, a excepción del glicerol, los componentes de la solución "madre" (**TABLA 2**). Una vez completada la disolución se procedió a la adición de la yema de huevo al 25% (V:V), procedente de huevos frescos de gallina de no más de siete días. La cáscara del huevo se lavó convenientemente con agua templada, pasando después sobre ella una porción de algodón o papel empapado en alcohol y dejándola secar. Una vez añadida la yema se centrifugó el diluyente completo durante 30 minutos a 1.000 g. y posteriormente recuperando el sobrenadante. Finalmente, se adicionó el glicerol

trás la centrifugación homogeneizando la mezcla.

TABLA 2. Composición de los diluyentes

<u>Diluyente 1</u>		
THAM (Tris(Hidroximetil)amino metano)	32,56	g
D-Fructosa	9,35	g
Acido citrico	17,02	g
Glicerol	20,00	ml
Yema de huevo	250	ml/l
Penicilina G	500.000	UI
Dihidroestreptomicina	625	mg/l
Agua Destilada Esteril	hasta 1000	ml
<u>Diluyente 2</u>		
Dextrano B (100.000 a 200.000 Pm)	39,53	g
Citrato Sodico * 2H ₂ O	6,88	g
TES (N-Tris(Hidroximetil)metil-2		
Acido Aminometánico Sulfónico	1,58	g
Glicina	3,63	g
Lactosa	101,08	g
Rafinosa	11,86	g
Fructosa	5,06	g
Glicerol	120,00	ml
Penicilina G	500.000	UI
Dihidroestreptomicina	625	mg/l
Agua Destilada Esteril	hasta 1000	ml
<u>Diluyente 3</u>		
Leche descremada en polvo	110,00	g
Citrato Sodico * 2H ₂ O (800 mM)	6,69	ml
Penicilina G	240.000	UI
Dihidroestreptomicina	300	mg/l
Agua Destilada Esteril	hasta 1000	ml

El diluyente 2 se preparó de forma similar al anterior, añadiendo todos los componentes reflejados en la **TABLA 2**, por orden, excepto el glicerol, el cual se adicionó en último lugar, una vez conseguida por homogeneización la disolución completa del resto de los constituyentes.

El diluyente utilizado para la refrigeración (Diluyente 3) se elaboró disolviendo en primer lugar la leche descremada en polvo en un recipiente de vidrio limpio y calentado a $+92/ +95^{\circ}\text{C}$ (tindalización), en bañomaría, durante 8-10 minutos, para inactivar los factores tóxicos de su fracción proteica. Posteriormente se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, momento en el cual se añadieron el resto de componentes.

3.2.2.2.3. Descongelación y contrastación pre-congelación y post-descongelación.

Las pajuelas fueron descongeladas utilizando un bañomaría a $+60^{\circ}\text{C}$ durante 8 segundos (Velocidad descongelación: $+1.500^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$).

Antes de proceder a la congelación de las muestras seminales se efectuó una contrastación pre-congelación en la cual se determinó el porcentaje de movimiento y calidad del mismo, la integridad del acrosoma y el porcentaje de E+.

Una vez descongeladas las dosis se evaluaron a las 0, 6 y 24 horas post-descongelación: FMP, FMR, %PIA, %E+ y FMP60.

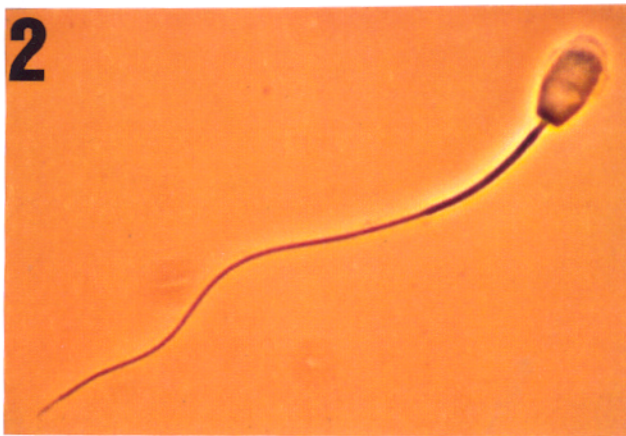
Además, para la experiencia 3 se determinó a las 0 horas post-descongelación el porcentaje (PP) e índice (IP) de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida.

3.2.2.2.3.1. Motilidad individual (MI).

La motilidad individual se expresó como el porcentaje de espermatozoides motiles (0-100%), estableciéndose también la calidad de dicho movimiento en una escala de 0 (acinesis) a 5 (movimiento progresivo muy rápido). Estos dos parámetros se determinaron por medio de un microscopio ($\times 10$) óptico en campo claro.

3.2.2.2.3.2. Estado del acrosoma.

Para establecer el grado de integridad acrosómica, las muestras fueron incluidas en una solución de glutaraldehído al 2% (V:V) en BL-1 (Pursel y Johnson, 1974), sin antibióticos, examinándose posteriormente por medio de microscopía de contraste de fases con objetivo de inmersión ($\times 100$). El resultado se expresa como el porcentaje del número de espermatozoides con acrosoma intacto (PIA) (LAMINA I).



LAMINA I: Evaluación del estado del acrosoma en espermatozoides de morueco tras la inclusión de las muestras en glutaraldehído al 2% en B.L.-1 y observación en microscopia de contraste de fases (1000 x). (1) Espermatozoide de morueco con acrosoma intacto. (2) Espermatozoide de morueco con el acrosoma dañado.

3.2.2.2.3.3. Test de endósmosis celular.

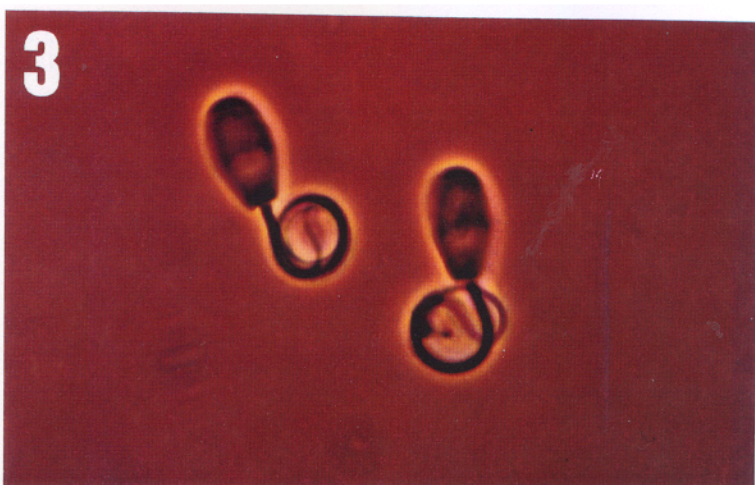
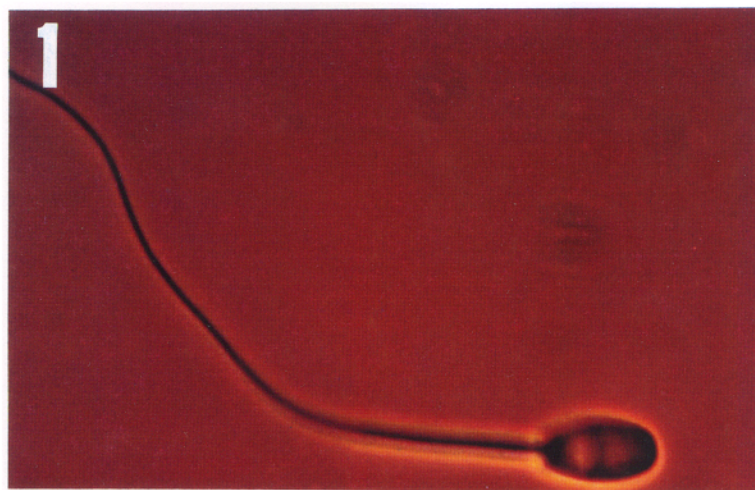
Para determinar la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide se sometió al mismo a una presión osmótica de 100 mOsm/Kg (Vázquez, 1980). Para ello se diluyeron 100 µl. de la muestra seminal en 1 ml. de la solución hipoosmótica, manteniéndose durante 30 min. a temperatura ambiente a +5°C según la procedencia de las muestras. Seguidamente se incluyeron en glutaraldehído al 2% en BL-1 y se realizó el recuento con microscopio de contraste de fases (40x), expresándose el número en porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (E+). Se consideró que un espermatozoide había reaccionado positivamente a esta prueba cuando se apreció torsión helicoidal de la cola (LAMINA II).

3.2.2.2.3.4. Termorresistencia.

Siguiendo la técnica reseñada por Fiser et al. (1989), hemos determinado también el porcentaje de motilidad espermática tras la incubación de la muestra de semen durante 1 h. a +39°C (FMP60).

3.2.2.2.3.5. S.P.A. (Sperm Penetration Assay).

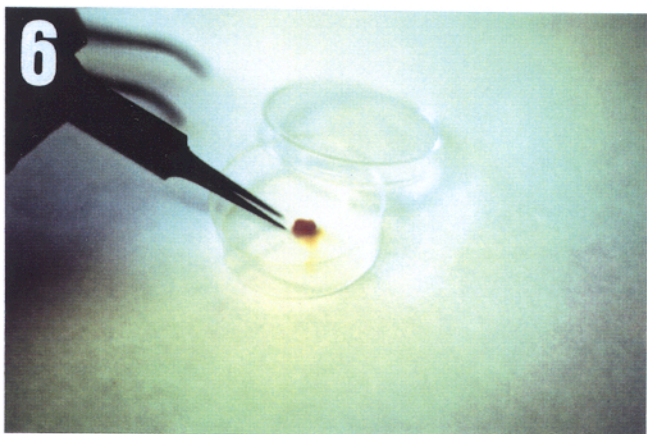
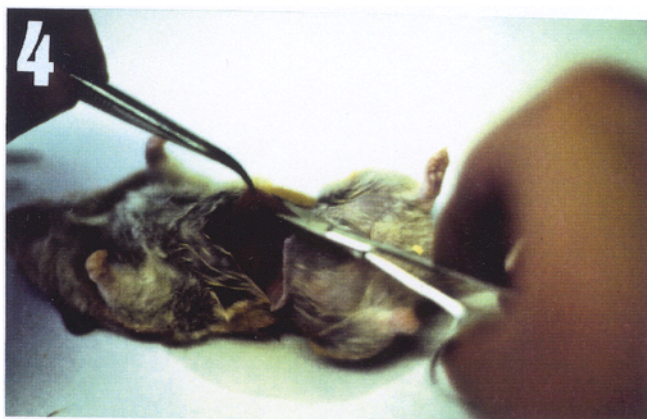
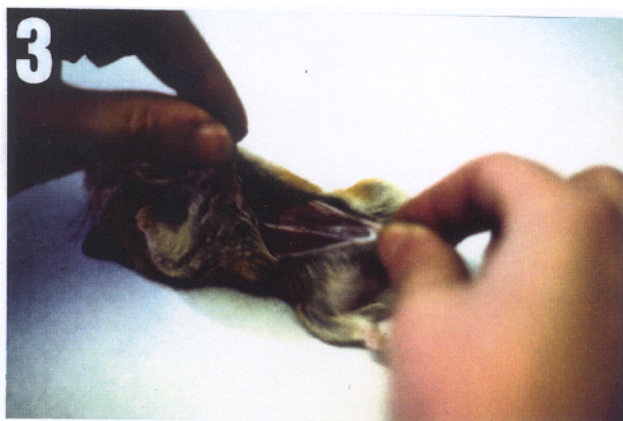
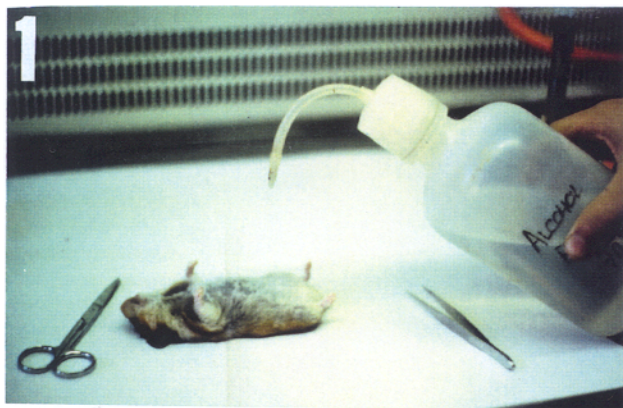
Para la realización del SPA nos hemos basado en los métodos descritos por Yanagimachi (1976) y Bousquet y Brackett (1982), para las especies humana y bovina, respectivamente.



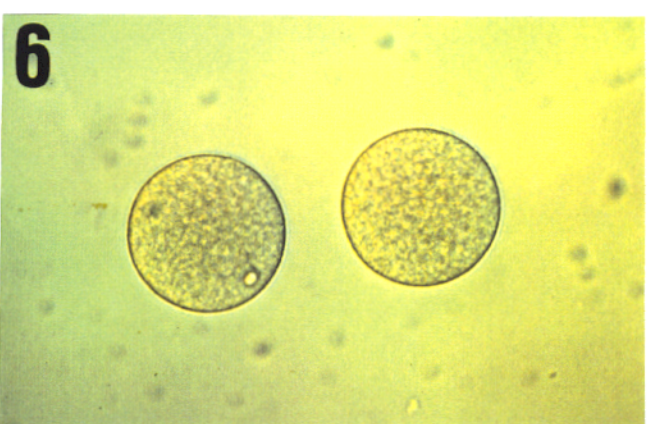
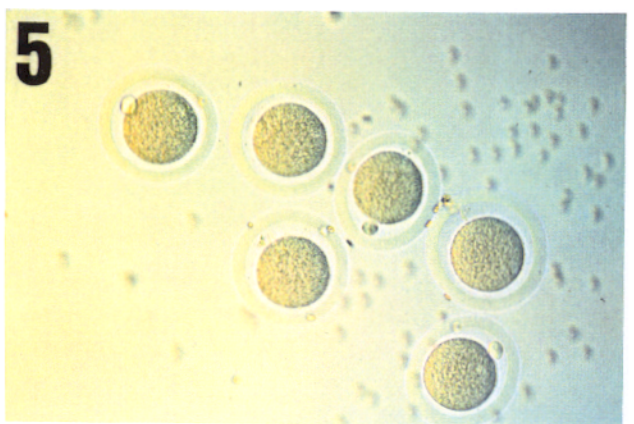
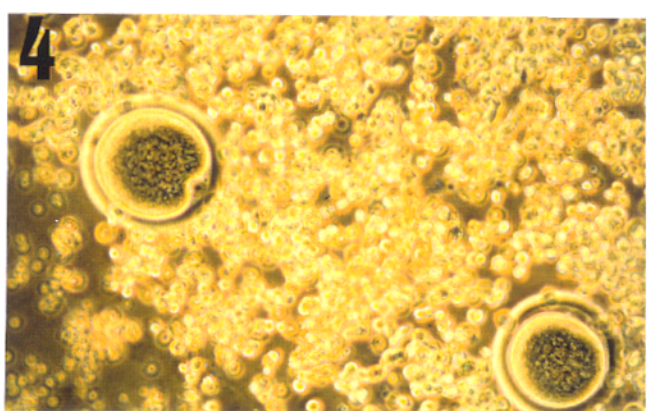
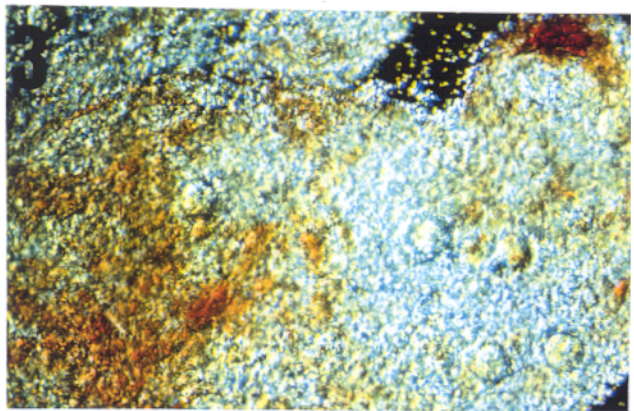
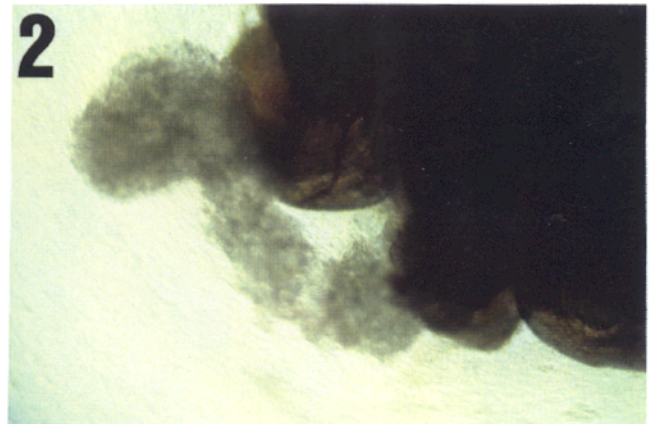
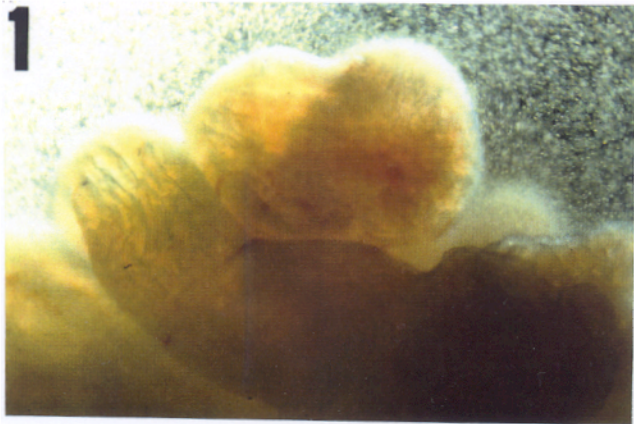
LAMINA II: Espermatozoides de morueco sometidos a la prueba de endósmosis celular con diferentes grados de respuesta (1000 x). **(1)** Endósmosis negativa. **(2)** Endósmosis positiva parcial. **(3)** Endósmosis positiva total.

Inducimos el desarrollo folicular en la hembra de hámster mediante la administración intraperitonealmente de 30 U.I. de PMSG, seguido a las 48-72 h. de 30 U.I. de HCG, por la misma vía a las 17-18 h, previa anestesia con eter etílico, se sacrifica al animal por dislocación cervical, extraemos los oviductos y los transferimos a un pocillo de recogida con PBS (**LAMINA III**). Bajo control estereomicroscópico, rasgamos la ampolla tubárica para permitir la salida del "cúmulus oophorus" con los ovocitos. Dispersamos las células de dicho complejo con hialuronidasa al 0,1% durante 3 minutos. Los ovocitos que presentan membrana pelúcida íntegra, citoplasma esférico y primer corpúsculo polar liberado, son contados y seleccionados; los ovocitos que no presentan estas características son eliminados (**LAMINA IV**). Los ovocitos seleccionados se transfieren a una placa de petri y se elimina la zona pelúcida mediante tratamiento con tripsina al 0,1% durante 1-3 min. A continuación se lavan de nuevo en PBS para eliminar los posibles restos de tripsina. Una vez libres de sus envolturas y limpios se colocan en grupos de 12-15 en placas de petri en microgotas de 350 μ l de BWW+0,3% BSA cubiertas por aceite de parafina. Posteriormente se realiza la inseminación, añadiendo 50 μ l de la suspensión espermática correspondiente (Concentración: 1×10^7 células/ml.) El tiempo que transcurre desde que se obtienen los ovocitos hasta que se realiza la inseminación debe ser inferior a los 30 min.

El tratamiento de las muestras seminales para su capacitación varía según las condiciones descritas en el diseño experimental. Al cabo de 4 a 5 h. de co-cultivo a +37°C en atmósfera saturada de humedad y con 5% de CO₂ procedemos a la valoración de los ovocitos con la ayuda de una lupa binocular a 300 aumentos. Para ello se aspiran y se lavan en BWW fresco con el fin de eliminar el exceso de espermatozoides que pudieran encontrarse adheridos a la membrana citoplasmática. Una vez lavados, se transfieren con una pipeta pasteur adelgazada a un porta (desengrasado en alcohol eter), colocándolos en posición central con una mínima cantidad de medio. Se sitúa el cubre adicionado previamente con cuatro puntos en sus esquinas de una mezcla de vaselina:parafina (9:1) y se comprime con cuidado para que los ovocitos se expandan. Se marca la situación del ovocito en la lupa para facilitar su observación al microscopio de contraste de fase (x 1.000).



LAMINA III: Técnica quirúrgica para la obtención de ovocitos en la hembra de hámster dorado. (1) Preparación de la hembra. (2) Incisión en la piel. (3) Apertura de la piel. (4) Incisión en la capa muscular. (5) Exteriorización del ovario, oviducto y cuerno uterino. (6) Extracción del oviducto en un pocillo de recogida esteril con PBS.



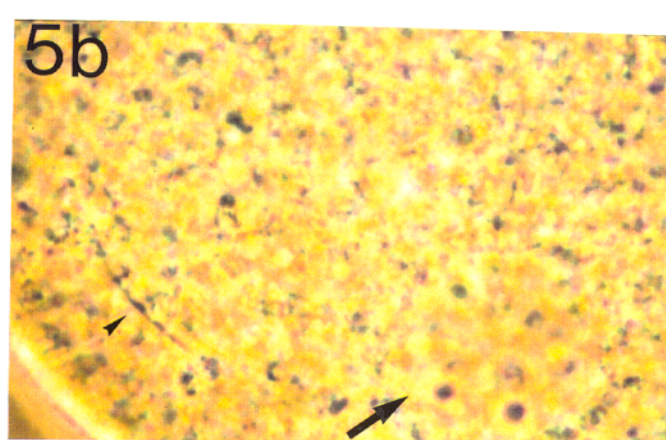
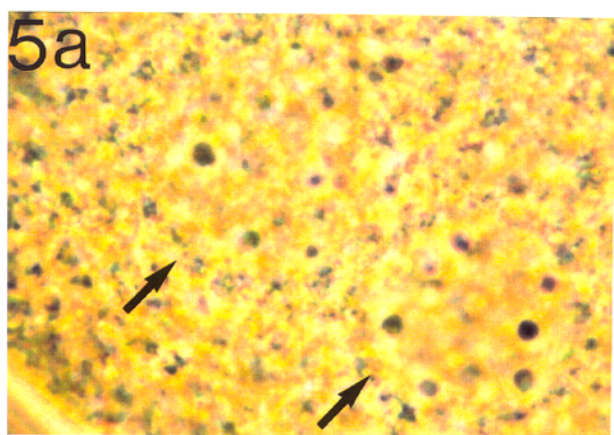
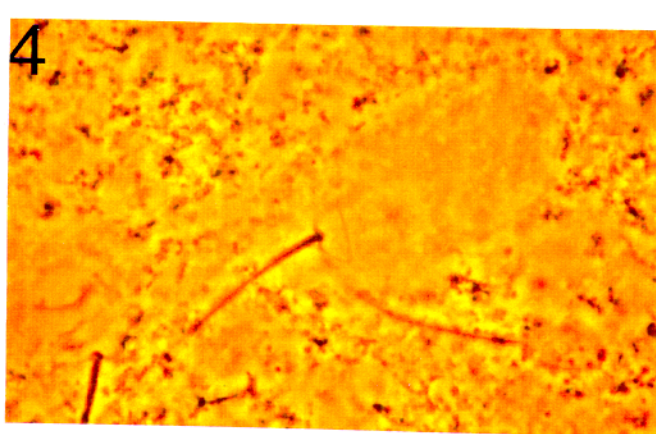
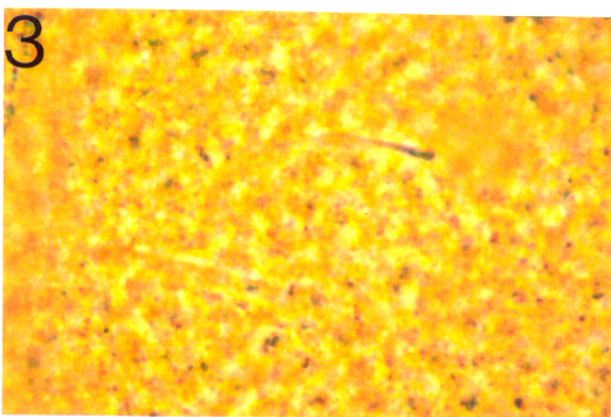
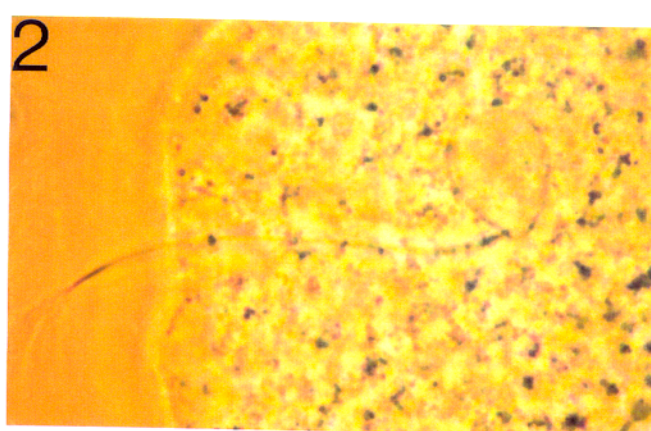
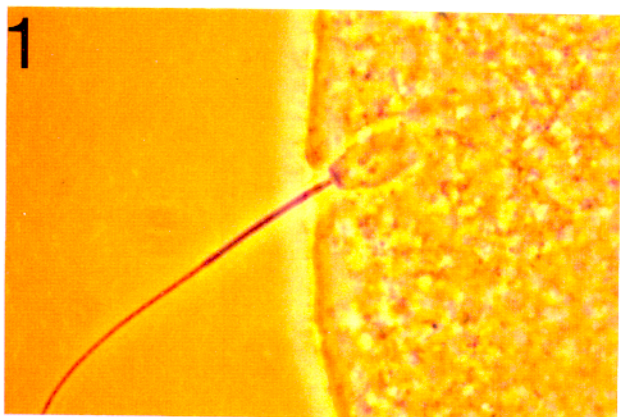
LAMINA IV: Obtención de ovocitos libres de zona pelúcida en el hámster dorado.

- (1) Localización de la ampolla del oviducto bajo control estereomicroscópico (20 x). (2) Salida del cumulus celular tras rasgar la ampolla (20 x). (3) y (4) Localización de los ovocitos entre las células del cúmulus (20 x y 100 x). (5) Ovocitos de hámster completamente desnudos (100 x). (6) Ovocitos de hámster desnudos y libres de zona pelúcida poco antes de ser introducidos en la placa de fecundación (100 x).

Se consideró que los ovocitos habían sido penetrados cuando presentaron en su citoplasma cabezas hinchadas o pronúcleos masculinos acompañados de colas espermáticas visibles (LAMINA V). La presencia de un sólo pronúcleo no se consideró como criterio adecuado de penetración, ya que los ovocitos de hamster pueden activarse partenogénicamente sin penetración espermática. Las preparaciones se observan en el momento de su montaje, ya que al no estar fijadas ni teñidas el material biológico es susceptible de deteriorarse. Los pronúcleos aparecen como masas oscuras rodeados de un área más clara del ooplasma, de tamaño variable según el grado de despolimerización de la cromatina. Frecuentemente los restos del flagelo espermático y el pronúcleo masculino se encuentran en distintos planos ópticos (LAMINA V: 5a Y 5b).

Con la identificación de los ovocitos obtenemos dos valores:

- Porcentaje de penetración (PP): Porcentaje de ovocitos que contienen en su citoplasma, al menos, una cabeza descondensada o un pronúcleo masculino, en relación al número total de ovocitos examinados.
- Índice de penetración (IP): Número total de cabezas espermáticas hinchadas o pronúcleos masculinos, dividido entre el número de ovocitos penetrados.



LAMINA V: Ovocitos de hámster dorado libres de zona pelúcida cocultivados con espermatozoides de morueco. Visualización en contraste de fases, sin fijación ni tinción previa (1000 x). Evolución del estadio de transformación de la cabeza espermática en el interior del vitelo. (1) Cabeza espermática aún sin descondensar recientemente incorporada al citoplasma del ovocito. (2) Cabeza espermática que ha iniciado su descondensación. Obsérvese el flagelo espermático en parte en el exterior del vitelo. (3) y (4) Espermatozoides en diversos estadios de descondensación de su cabeza. (5a) Ovocito presentando dos pronúcleos en su citoplasma (flechas). (5b) Trás observar los diferentes planos ópticos se detectan los restos del flagelo espermático (punta de flecha), correspondientes al pronúcleo masculino (flecha).

3.2.2.3. Capacitación y reacción acrosómica "in vitro"

Para el estudio de la capacitación y reacción acrosómica "in vitro" hemos utilizado el procedimiento básico descrito por **Thompson y Cummins (1984)**, para espermatozoides de morueco. Sobre esta metodología original se han realizado ligeras modificaciones.

3.2.2.3.1. Medios de cultivo

Los medios empleados en la manipulación de gametos, swim-up, preincubación espermática y co-cultivo, han sido el PBS de Dulbecco modificado y el medio de **Biggers, Whitten y Whittingham (BWW) (1971)**.

Los medios se esterilizaron por paso a través de filtros de membrana tamaño de poro (0,8 y 0,22 μm) en cámara de flujo laminar antes de su utilización.

PBS de Dulbecco modificado:

Este medio ha sido empleado en la manipulación de los ovocitos y en el lavado espermático. La composición del medio se indica en la **TABLA 3**. El pH del medio se ajustó a 7,2.

TABLA 3. Composición del PBSDm.

NaCl	136,89	mM
KCl	2,68	mM
Na ₂ HPO ₄	8,10	mM
KH ₂ PO ₄	1,46	mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,88	mM
Na Piruvato	0,32	mM
Glucosa	5,55	mM
Rojo Fenol	0,01	mM
Penicilina	0,06	g/l
Streptomycina	0,05	g/l
BSA (fracción V)	3,00	g/l

BWW:

El medio utilizado para el swim-up, la preincubación espermática y el co-cultivo ha sido el BWW suplementado con un 0,3% de albúmina sérica bovina (BSA) fracción V. La composición del medio se refleja en la TABLA 4. El medio se introduce en la estufa (5% CO₂) 180 min. antes de su empleo, para que se equilibre y así mantener un pH constante de 7,4 .

TABLA 4. Composición del Medio BWW.

(Biggers, Whitten y Whittingham,1971)

NaCl	94,59	mM
KCl	74,6	mM
Lactato de Ca5H ₂ O	308,3	mM
KH ₂ PO ₂	136,1	mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	246,5	mM
NaHCO ₃	84,0	mM
Piruvato de Na	0,25	mM
Lactato de Na	21,58	mM
Glucosa	5,56	mM
Albúmina de Bovino cristalina	3,00	g/l
Penicilina	0,06	g/l
Estreptomicina	0,05	g/l

3.2.2.3.2. Lavado espermático y recuperación de espermatozoides móviles (REM)

Los espermatozoides conservados fueron lavados por centrifugación (600 g x 7 min. x 2 veces), en PBS (1:5 V/V). Tras el último lavado se aísla la población espermática móvil empleando la técnica del "swim-up". Para ello se recubre cuidadosamente el pellet resultante (500x10⁶ espermatozoides totales) del último lavado con 1 ml. de BWW + 0,3% BSA y se incuba durante 1 h. a +37°C en 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad.

Transcurrido este tiempo se recuperan los espermatozoides comprendidos en los 0,5 ml. superiores.

3.2.2.3.3. Preincubación espermática

La fracción recuperada en el swim-up es diluída hasta una concentración de 1×10^7 células/ml. en BWW + 0,3% BSA fresco e incubada en un volumen de 5 ml. en las mismas condiciones que en el apartado anterior, excepto cuando las indicaciones del diseño experimental requerían utilizar temperaturas de +39°C. El periodo máximo de incubación de las muestras fué de 24 h.

3.2.2.3.4. Valoración de resultados

Para determinar los cambios que sufren los espermatozoides durante la capacitación y la reacción acrosómica "in vitro" hemos empleado en la experiencia 1 la técnica de la triple tinción y un sistema de fecundación "in vitro" heterólogo. Mientras que en la experiencia 2, hemos utilizado únicamente la TST, debido a su sencillez, fiabilidad y repetibilidad.

3.2.2.3.4.1. Mediante TST

Hemos empleado la técnica descrita por Talbot y Chacon (1981), para espermatozoides humanos, adaptada por nosotros posteriormente a semen de morueco (Garde et al., 1992).

Las muestras espermáticas fueron procesadas aplicando la siguiente metodología para su tinción: 100 µl. de la muestra correspondiente fueron diluídos en el mismo volumen de tripan azul al 1% en BWW e incubados durante 10 min. a +37°C. Seguidamente se procedió a realizar una extensión sobre un portaobjetos desengrasado y precalentado. Tras secarse al aire, se fijó a temperatura ambiente con una solución de glutaraldehído al 3%, tamponada con cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,2) durante 30 min. El porta se lavó seguidamente con agua bidestilada, se secó al aire y se tiñó durante 10 min. a +41°C con una solución al 30% de etanol que contenía 0,8% de marrón Bismark a pH 2,8; nuevamente se lavó cuidadosamente con agua bidestilada, se secó al aire y se tiñó con una solución de rosa Bengala al 0,8% tamponada en 0,1 M. de Tris a pH 5,3 durante 20 min. , se lavó, secó, montó

en Permunt y se observó en un microscopio óptico de campo claro a 1.000 aumentos.

Las características de la tinción en función de la vitalidad espermática y estatus acrosomal se detallan en la **FIGURA 8**. Aplicando esta técnica de tinción se puede clasificar la célula espermática en cuatro estados diferentes:

- a. Espermatozoide muerto, con acrosoma intacto (acrosoma teñido de rosa y región post-acrosomal de color marrón oscuro).
- b. Espermatozoide muerto, sin acrosoma (región acrosomal y post-acrosomal de color marrón oscuro).
- c. Espermatozoide vivo que no ha experimentado la R.A. (acrosoma teñido de rosa y región post-acrosomal teñida muy levemente por el marrón).
- d. Espermatozoide vivo que ha experimentado la R.A. (región acrosomal y post-acrosomal teñidas muy levemente por el marrón).

3.2.2.3.4.2. Mediante la prueba de penetración espermática.

Prueba ya descrita en el apartado 3.2.2.2.3.5 de esta tesis.

3.2.2.4. Inseminación artificial con semen congelado y contrastado.

Para completar las experiencias 2 y 3 se han inseminado 150 ovejas de raza manchega distribuidas en cinco lotes, correspondiéndose cada lote con uno de los sementales empleados.

Los lotes se hicieron totalmente homogéneos en cuanto a condición corporal, peso, edad, estado productivo e intervalo último parto-I.A.

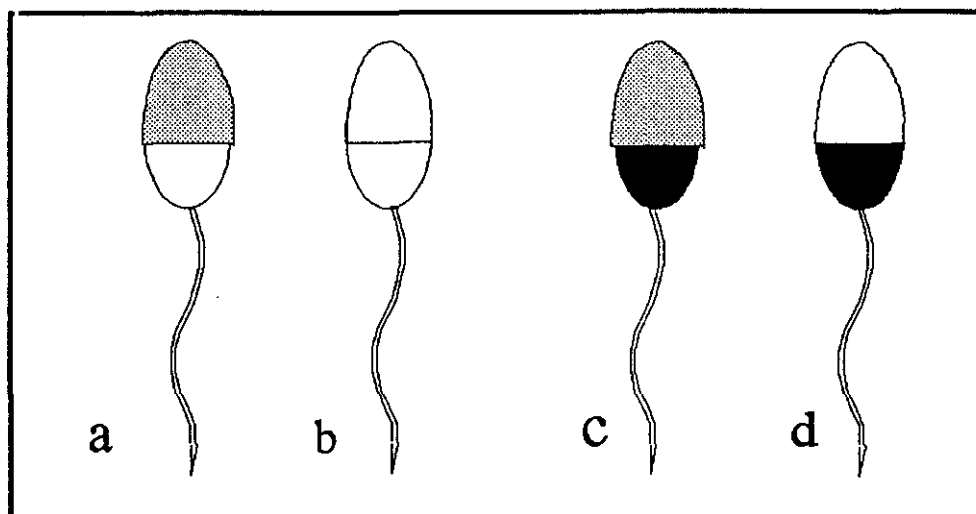


FIGURA 8: Categorización de los espermatozoides según la técnica de la triple tinción. (a) Espermatozoide vivo con acrosoma intacto. (b) Espermatozoide vivo sin acrosoma (c) Espermatozoide muerto con acrosoma (d) Espermatozoide muerto sin acrosoma.

3.2.2.4.1. Dosis empleadas.

Se ha utilizado semen congelado de cinco moruecos del Esquema de Selección de la raza ovina Manchega. Las dosis se obtuvieron en los meses de Julio y Agosto de 1991 en ocho congelaciones independientes, realizándose las inseminaciones en Septiembre del mismo año.

Como lote testigo, se emplearon cinco ovejas por macho (25-30 en total), que se inseminaron con semen refrigerado conservado a +15°C, durante 2 h.

En ambos casos se aplicó una sola dosis de semen (500×10^6 espermatozoides) en un volumen de 0,5 ml. por oveja.

3.2.2.4.2. Preparación de las hembras

Las ovejas fueron sincronizadas mediante el empleo de esponjas intravaginales de acetato de fluorogestona (FGA) durante 14 días. Para inducir el celo se aplicaron 425 U.I. de PMSG en el momento de la retirada de la esponja.

La I.A. se realizó a las 55 ± 1 h. del citado tratamiento por vía cervical, aplicando la dosis seminal con la ayuda de un espéculo bivalvo, depositando el semen lo más profundamente posible en el canal cervical.

3.2.3. Análisis estadístico.

EXPERIENCIA 1.

Los datos expresados en porcentaje fueron comparados mediante el empleo de un análisis de varianza usando el modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + H_j + T_k + SH_{ij} + ST_{ik} + HT_{jk} + SHT_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

donde:

Y_{ijkl} : es el valor observado

μ : es la media poblacional

S_i : es el efecto fijo debido al tipo de semen

H_j : es el efecto fijo debido al tiempo de preincubación

T_k : es el efecto fijo debido a la temperatura de preincubación.

SH_{ij} , ST_{ik} , HT_{jk} , SHT_{ijk} : son los efectos conjuntos del tipo de semen empleado, hora y temperatura de preincubación analizada.

ϵ_{ijkl} : es el error residual correspondiente a cada observación.

Unicamente los valores obtenidos de espermatozoides vivos sin acrosoma fueron convertidos en el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje antes de su análisis.

Las diferencias significativas entre grupos fueron detectadas mediante el empleo del test de significación mínima de Fisher.

EXPERIENCIA 2.

El efecto del factor individuo sobre la fisiología de las células espermáticas que sobreviven a la congelación fué analizado mediante el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + MA_i + H_j + MAH_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} : es el valor observado

μ : es la media poblacional

MA_i : es el efecto fijo debido al macho donante del semen

H_j : es el efecto fijo debido al tiempo de preincubación

MAH_{ij} : son los efectos conjuntos del morueco donante del semen y de la hora de preincubación.

ϵ_{ijk} : es el error residual correspondiente a cada observación.

Los datos de cada grupo fueron comparados mediante análisis de varianza y el grado de significación de las diferencias detectadas fué establecido mediante el test de significación mínima de Fisher.

Los porcentajes de partos obtenidos tras la inseminación artificial fueron comparados entre machos por test de Chi cuadrado.

El grado de asociación existente entre el efecto ejercido por la congelación sobre la fisiología espermática y la fertilidad "in vitro" se ha establecido mediante análisis multivariante de correlaciones.

EXPERIENCIA 3.

Los valores obtenidos de los distintos parámetros seminales analizados en los cinco sementales se han comparado mediante el empleo del análisis de varianza, siguiendo el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + MA_i + H_j + MAH_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} : es el valor observado

μ : es la media poblacional

MA_i : es el efecto fijo debido al macho donante del semen

H_j : es el efecto fijo debido al tiempo de conservación post-descongelación.

MAH_{ij} : son los efectos conjuntos del morueco donante del semen y del tiempo de conservación post-descongelación.

ε_{ijk} : es el error residual correspondiente a cada observación.

El grado de significación de las diferencias detectadas entre sementales fué establecido mediante el test de significación mínima de Fisher.

Se han obtenido también las correlaciones lineales existentes entre todas las variables estudiadas.

Para conocer la seguridad con qué se puede predecir o diagnosticar el poder fecundante "in vitro" de una dosis de semen congelado se realizó un análisis de discriminancia. Para ello se han clasificado los datos obtenidos del sistema de FIV heterólogo en tres grupos:

$PP < 40$ - baja fertilidad

$40 > PP < 70$ - fertilidad media

$PP > 70$ - fertilidad alta

Mediante este análisis se determina la exactitud con la que los otros parámetros seminales clasifican una dosis según su poder fecundante "in vitro". Para ello se calcula la función:

$$Y = \sum b_i X_i$$

donde:

b_i es el coeficiente de discriminancia para la variable i

X_i es el valor de la variable i

n es el número de variables independientes

La exactitud de la función de discriminancia viene determinada mediante los valores:

Wilk's Lambda: Este valor nos indica la separación entre grupos distintos. Cuánto más pequeña sea ésta, mayor será la separación de las variables dependientes entre grupos y más homogénea dentro de un mismo grupo. Este coeficiente toma valores comprendidos entre 0 y 1.

4. RESULTADOS.

Siguiendo la metodología empleada los resultados obtenidos se han dividido en tres grandes apartados. En primer lugar se analiza el efecto ejercido por la congelación sobre la fisiología de las células espermáticas de morueco que obreviven a dicho proceso. A continuación, se evalúa la influencia del factor individual sobre la funcionalidad de los espermatozoides que resisten a los procesos de congelación y sus repercusiones en la fertilidad "in vitro" e "in vivo". Por último, se realiza un análisis de las pruebas empleadas para determinar "in vitro" la viabilidad de las células espermáticas de morueco congeladas-descongeladas.

4.1. EFECTO DE LA CONGELACION SOBRE LA FUNCION ESPERMATICA IN VITRO.

Los resultados obtenidos del estudio de los efectos ejercidos por el método de conservación del semen y la temperatura de preincubación del mismo han sido divididos en dos apartados para su análisis, valorando en primer lugar la influencia ejercida por el sistema de conservación del semen independientemente de la temperatura de preincubación del mismo empleada, para estudiar posteriormente los efectos debidos a la acción conjunta de los dos factores.

Los resultados medios obtenidos en relación con el efecto ejercido por la congelación sobre los parámetros espermáticos analizados se muestran en la **TABLA 5**. Como puede observarse, existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) para todos los parámetros seminales analizados, a excepción de para el porcentaje de células espermáticas muertas con acrosoma, en función del sistema de conservación del semen empleado.

Los resultados de la determinación del porcentaje de motilidad se muestran en la **FIGURA 9**. Los valores de motilidad a lo largo del tiempo de incubación para el semen congelado son más bajos que para el semen refrigerado ($p < 0,001$) ($40,0 \pm 0,41$ versus $47,6 \pm 0,41$, media más error standard de la media).

TABLA 5. Efecto de la congelación del semen de morueco sobre la fisiología espermática "in vitro" (*).

semen	MI	E+	VA	VR	MR	MA	PP	IP
FRES	47,5 ^a	45,3 ^a	40,3 ^a	14,7 ^a	35,5 ^a	8,4 ^a	50,1 ^a	1,8 ^a
CONG	41,1 ^b	32,1 ^b	22,6 ^b	13,1 ^b	53,6 ^b	8,7 ^a	38,8 ^b	1,5 ^b

^{a,b}: Grupos con superíndice idéntico en la misma columna no son diferentes significativamente ($p < 0,001$).

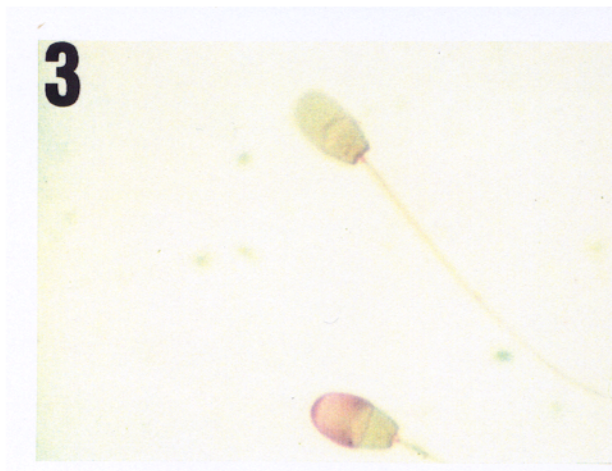
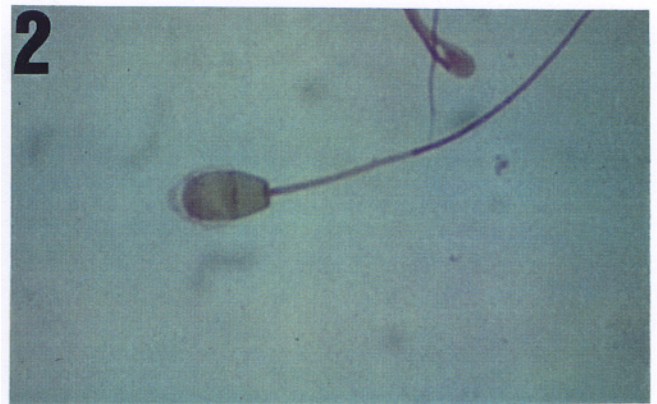
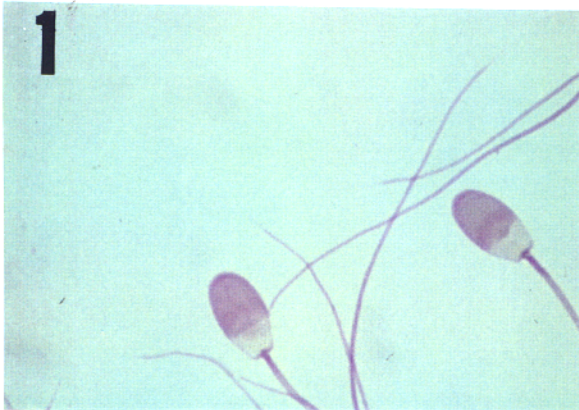
(*) Todos los valores se expresan en porcentaje a excepción de IP.

Este parámetro disminuye con el tiempo de incubación en ambos grupos ($p < 0,001$). Sin embargo, no existe interacción ($p > 0,05$) entre el tratamiento del semen y el tiempo de cultivo del mismo, lo cual indica que la motilidad evoluciona de forma paralela para los dos métodos de conservación del semen con el transcurso del tiempo.

La proporción de espermatozoides que presentaron endósmosis positiva (**FIGURA 10**) obtenida para las muestras seminales sometidas al proceso de congelación fue siempre inferior ($p < 0,001$) a la reflejada para el semen refrigerado ($32 \pm 0,5$ versus $45,3 \pm 0,5$). Al igual que la motilidad, este parámetro decrece con el tiempo de incubación del semen para los dos tratamientos estudiados ($p < 0,001$), sin que exista interacción significativa ($p > 0,05$) entre el método de conservación del semen y el tiempo de incubación al que se somete al mismo.

La estimación del estado del acrosoma y de la viabilidad del semen de morueco se realizó de forma simultánea mediante el empleo de la técnica de Triple Tinción (**LAMINA VI**), la cual clasifica los espermatozoides de una población espermática en cuatro categorías distintas, en función del estado del acrosoma y de la viabilidad celular:

- a) espermatozoide vivo con acrosoma intacto (VA)
- b) espermatozoide vivo sin acrosoma (VR)(reacción acrosómica verdadera)
- c) espermatozoide muerto con acrosoma (MA)
- d) espermatozoide muerto sin acrosoma (MR)(reacción acrosómica falsa).



LAMINA VI: Espermatozoides de morueco teñidos por la técnica de triple tinción (1000 x). **(1)** Espermatozoides vivos con acrosoma intacto. **(2)** Espermatozoide muerto sin acrosoma. **(3)** Espermatozoide muerto sin acrosoma (flecha) y espermatozoide muerto con acrosoma intacto (punta de flecha). **(4)** Espermatozoide vivo sin acrosoma.

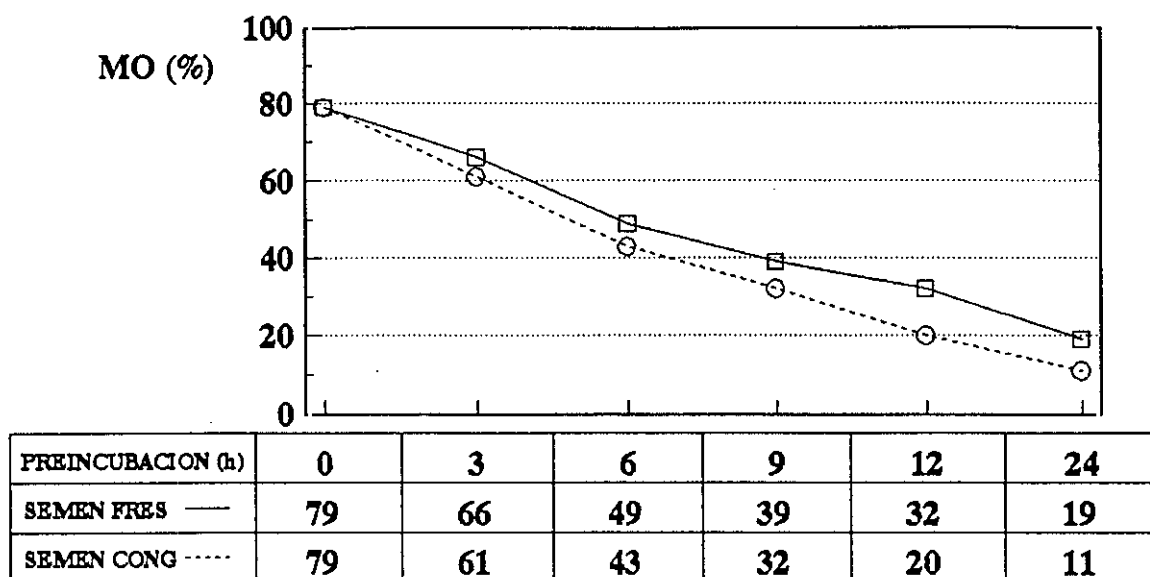


FIGURA 9: Evolución del porcentaje de motilidad espermática durante un periodo de preincubación de 24 horas a 37°C, dependiendo del sistema de conservación del semen empleado.

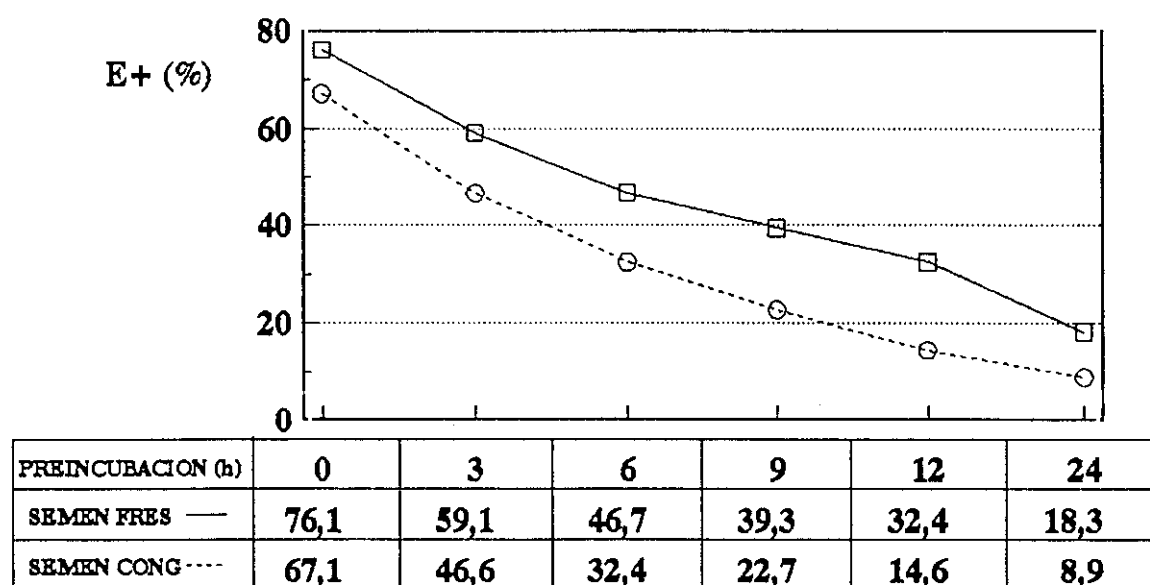


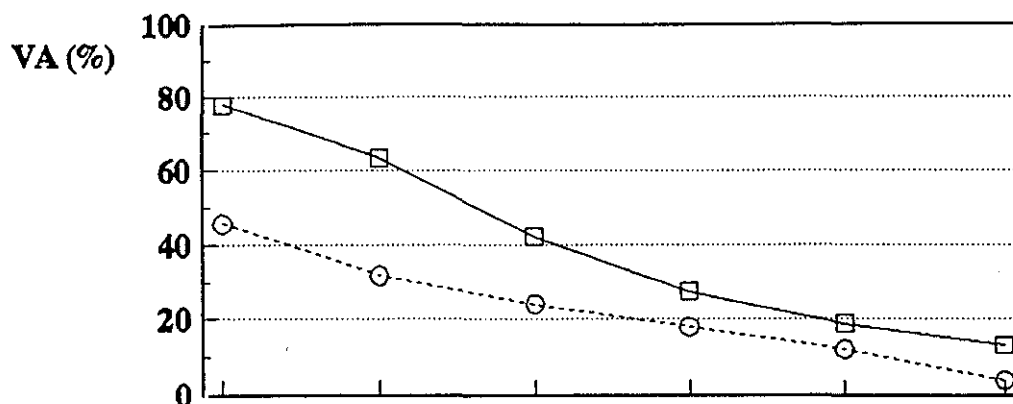
FIGURA 10: Evolución del porcentaje de endósmosis positiva durante un periodo de preincubación de 24 horas a 37°C, dependiendo del sistema de conservación del semen empleado.

En la **FIGURA 11** se refleja la evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto para los dos sistemas de conservación del semen empleados. La técnica de la congelación hace que la proporción de estos espermatozoides sea inferior, para todos los tiempos de preincubación estudiados, con respecto a las muestras refrigeradas ($p < 0,001$). Los valores medios de este parámetro son más elevados ($p < 0,001$) para el semen refrigerado que para el congelado ($40,4 \pm 0,37$ *versus* $22,6 \pm 0,37$), declinando este parámetro con el progresivo aumento del período de incubación en ambos tratamientos ($p < 0,001$). Durante la preincubación del semen refrigerado se observa que aunque los espermatozoides vivos con acrosoma intacto disminuyen, dicho descenso no se refleja en un aumento simultáneo de los muertos con el acrosoma dañado, ya que el aumento de este tipo de espermatozoides fué siempre inferior al descenso del porcentaje de vivos con acrosoma para cada intervalo de tiempo estudiado. Ello demuestra la evolución de espermatozoides vivos con acrosoma, a espermatozoides reaccionados y posteriormente a muertos sin acrosoma.

Sin embargo, la evolución de las distintas subpoblaciones espermáticas categorizadas por la T.S.T. en las muestras congeladas, a pesar de seguir la misma dinámica que en las refrigeradas se produce de una forma más rápida con respecto al tiempo de preincubación del semen ($p < 0,001$).

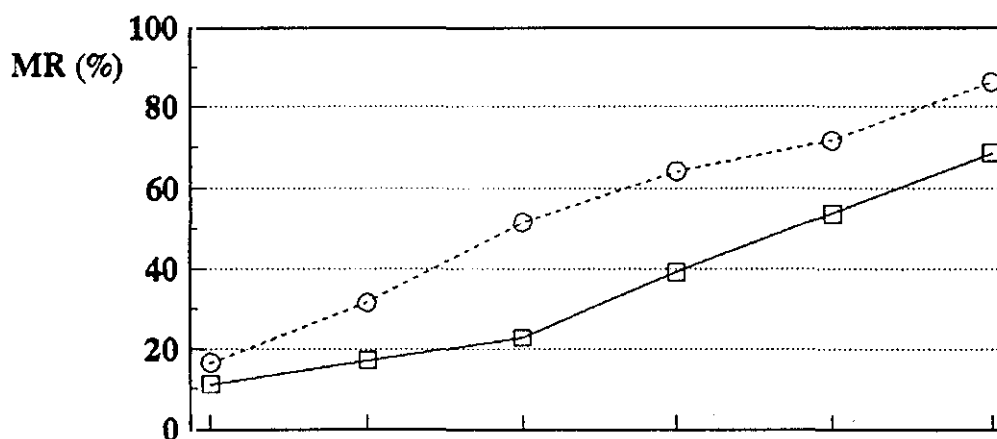
Como puede observarse en la **FIGURA 11**, existe interacción significativa ($p < 0,001$) entre el tratamiento del semen y el tiempo de incubación al que se somete el mismo, lo cual indica que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto no decrece de forma paralela en los dos métodos de conservación del semen estudiados, siendo las muestras congeladas las que presentan un descenso más rápido en este parámetro.

Las muestras seminales refrigeradas presentan unos valores medios de espermatozoides muertos sin acrosoma (**FIGURA 12**) inferiores ($p < 0,001$) que las congeladas ($35,3 \pm 0,45$ *versus* $53,6 \pm 0,45$). Esta proporción aumenta con el tiempo de incubación en ambos grupos ($p < 0,001$) de forma similar, pero no uniforme. Como puede observarse, cuando los espermatozoides son congelados la proporción de espermatozoides muertos con acrosoma dañado empieza a elevarse mucho antes que para las dosis refrigeradas ($p < 0,001$), ello nos indica la interacción existente entre el tratamiento del semen y el tiempo de preincubación del mismo para este parámetro.



PREINCUBACION (h)	0	3	6	9	12	24
SEMEN FRES —	77,6	63,4	42,1	27,4	18,7	13,1
SEMEN CONG ----	45,6	31,7	24,0	18,0	12,0	3,8

FIGURA 11: Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto durante un periodo de preincubación de 24 horas a 37°C, dependiendo del sistema de conservación del semen empleado.



PREINCUBACION (h)	0	3	6	9	12	24
SEMEN FRES —	11,2	17,3	23,0	39,3	53,7	68,6
SEMEN CONG ----	16,7	31,6	51,5	64,1	71,7	86,2

FIGURA 12: Evolución del porcentaje de espermatozoides muertos sin acrosoma durante un periodo de preincubación de 24 horas a 37°C, dependiendo del sistema de conservación del semen empleado.

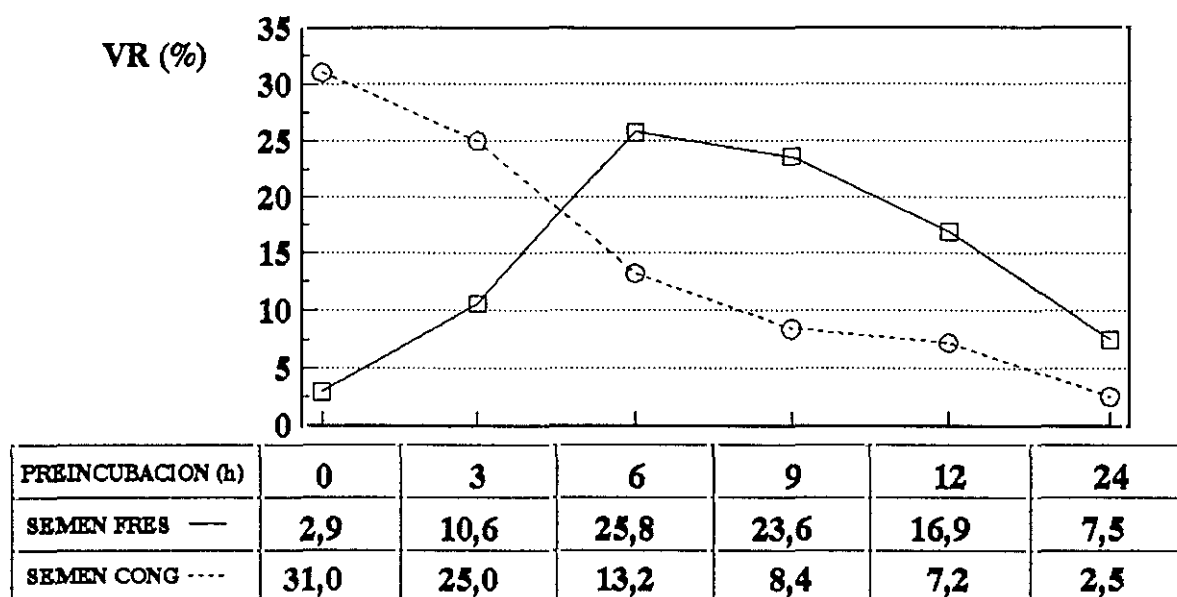


FIGURA 13: Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma durante un periodo de preincubación de 24 horas a 37°C, dependiendo del sistema de conservación del semen empleado.

En la FIGURA 13 se representan los resultados medios de reacción acrosómica observados tras la preincubación del semen, sometido a los dos tratamientos de conservación anteriormente referidos. Para el semen congelado, los espermatozoides vivos sin acrosoma van sufriendo una disminución brusca durante el tiempo de preincubación ($p < 0,001$), desde valores medios iniciales del 31% hasta el 2,5% a las 24 horas. Por el contrario, en las muestras refrigeradas se observa un incremento paulatino en el número de reacciones acrosómicas, estableciéndose unos valores mínimos a las 0 horas (2,9%), aumentando dichos valores a partir de las 3 horas (10,6%) para aparecer a las 6 horas el máximo porcentaje de células espermáticas reaccionadas (25,2%); surgiendo a partir de este momento un descenso gradual en este parámetro. Las posibilidades de fertilización para el semen congelado se van reduciendo con respecto al grupo control (refrigerado) a medida que aumenta el periodo de incubación espermática, observándose una disminución brusca en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y sin acrosoma, y un incremento en la tasa de espermatozoides muertos con acrosoma dañado mucho más acentuado que en las muestras sometidas a refrigeración (FIGURA 14 Y 15).

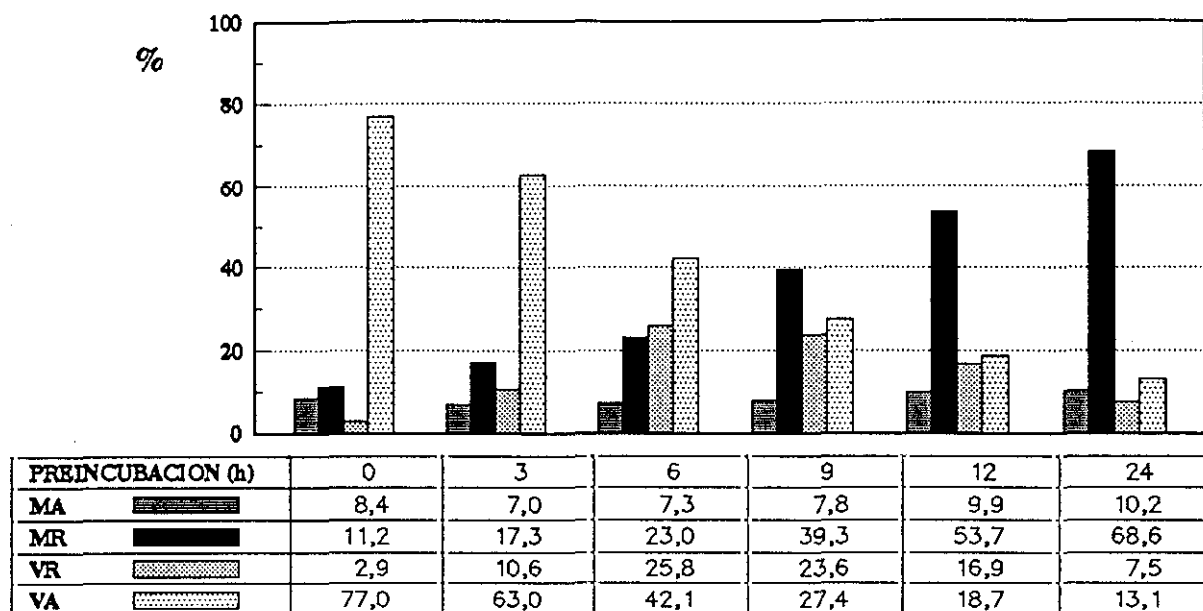


FIGURA 14: Evolución, durante un periodo de preincubación de 24 h, de las 4 categorías espermáticas determinadas por la TST en semen refrigerado de morueco.

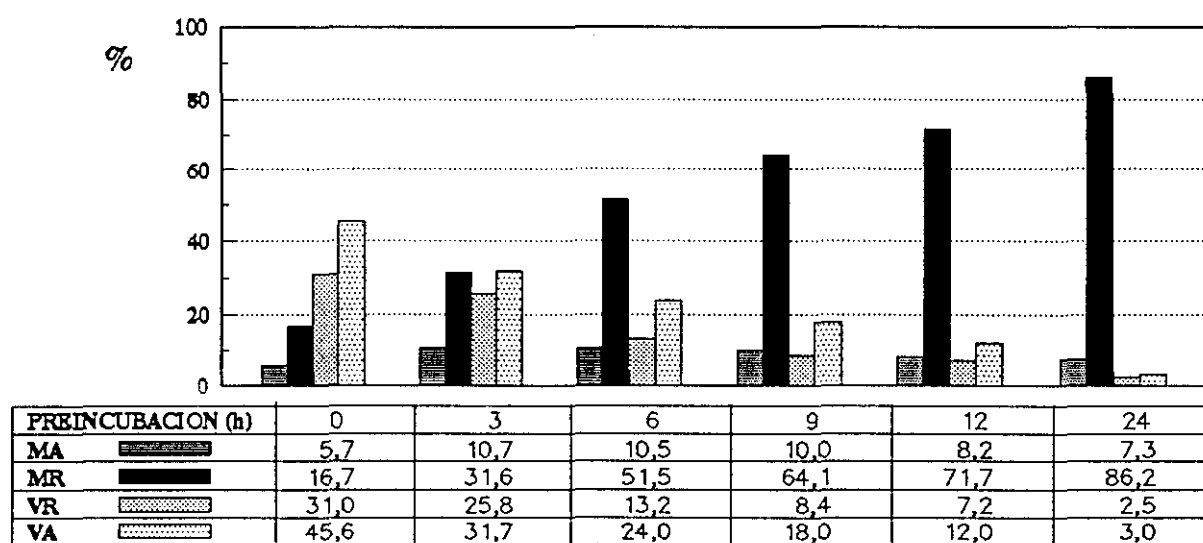


FIGURA 15: Evolución, durante un periodo de preincubación de 24 h, de las 4 categorías espermáticas determinadas por la TST en semen congelado de morueco.

En estas mismas **figuras 14 Y 15** se observa que la categoría de espermatozoides muertos con el acrosoma íntegro se mantiene constante desde las 3 horas hasta el final del periodo de incubación, no existiendo diferencias significativas en relación con el método de conservación empleado ($p > 0,05$).

En la **figuras 16 y 17** se muestran los resultados de la prueba de penetración espermática (SPA). Los porcentajes de penetración obtenidos tras los distintos tiempos de preincubación del semen (**FIGURA 16**) son significativamente diferentes ($p < 0,001$) en función del método de conservación seminal empleado, siendo más bajos los valores resultantes de las muestras congeladas que de las refrigeradas (38,8% *versus* 50,1%).

Por otra parte, los índices de penetración espermática (**FIGURA 17**) alcanzados tras las preincubación de las muestras seminales fueron también estadísticamente diferentes ($p < 0,001$), reflejándose unos valores de 1,8 y de 1,5 para semen refrigerado y congelado, respectivamente.

Como se representa en la **figura 16**, el mayor porcentaje de penetración se aprecia a las 0 y 9 horas de preincubación para el semen congelado (79,2%) y refrigerado (72,3%), respectivamente. Del mismo modo, se observa en esta figura que las posibilidades de fertilización para las muestras congeladas se van reduciendo a medida que aumenta el periodo de preincubación, apreciándose los valores más bajos a las 24 horas (5,6%).

Por el contrario, cuando las muestras empleadas son refrigeradas se obtiene el porcentaje de penetración más bajo a las 0 horas (23,8%), incrementándose hasta unos valores máximos (72,3%) a las 9 horas y decreciendo a partir de aquí hasta el final del periodo de incubación (35,5%). De este modo, los resultados obtenidos muestran que existe una interacción ($p < 0,001$) entre el tipo de tratamiento aplicado al semen y el tiempo de preincubación al que es sometido sobre los resultados de penetración espermática. En cuanto al número de espermatozoides que penetran en cada ovocito, podemos observar en la **figura 17** que evoluciona de una forma muy similar al porcentaje de penetración, disminuyendo la tasa de poliespermia a lo largo de todo el periodo de incubación para las muestras congeladas (de 2,09 a 1,0). Al contrario de lo que sucede con el semen refrigerado, el cual presenta el máximo entre las 3 y las 9 horas de incubación (de 1,8 a 1,94).

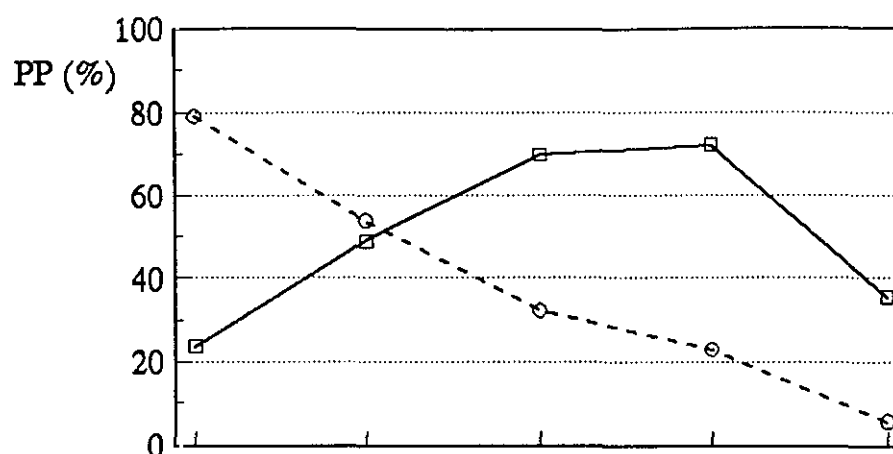


FIGURA 16: Efecto del sistema de conservación del semen sobre la cinética del test de hámster: Relación entre porcentaje de penetración (PP) y tiempos de preincubación.

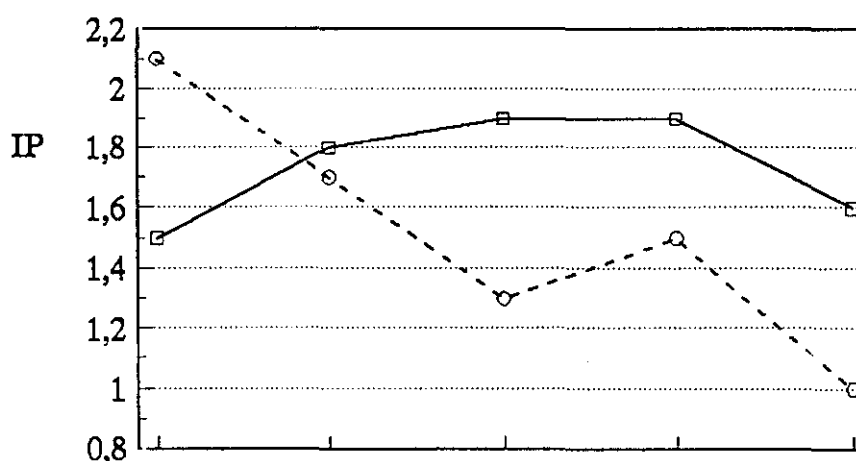


FIGURA 17: Efecto del sistema de conservación del semen sobre la cinética del test de hámster: relación entre índice de penetración (IP) y tiempos de preincubación.

Existe un efecto de la temperatura de preincubación y del metodo de conservación del semen sobre las características biológicas de las células espermáticas superviviente a la congelación, así se reflejan en la **tabla 6** los resultados medios obtenidos tras la preincubación de las muestras seminales a temperaturas de +37 ó +39°C. En esta tabla se muestran diferencias significativas en la mayoría de los parámetros analizados en función de la temperatura a la cual se preincuba el semen.

TABLA 6. Efecto de la temperatura de preincubación del semen sobre los parámetros seminales analizados ^(*).

T ^a	MI	E+	VA	VR	MR	MA	PP	IP
37°C	48,3 ^a	40,8 ^a	39,6 ^a	14,4 ^A	42,1 ^a	7,9 ^A	42,1	1,6
39°C	40,3 ^b	36,5 ^b	28,3 ^b	13,3 ^B	47,1 ^b	9,1 ^B	44,1	1,6

Grupos con superíndice distinto en la misma columna son diferentes: ^{a,b} (p<0,001) y ^{A,B} (p<0,01).

^(*): Todos los datos se expresan en porcentaje, menos I.P.

En las **figuras 18 a 24** se representa las evolución de los diferentes parámetros estudiados para las muestras refrigeradas y congeladas tras la preincubación de las mismas durante un periodo máximo de 24 horas a las temperaturas de +37 y +39°C.

En cuanto a los valores de motilidad, se registraron descensos más rápidos para las muestras incubadas a +39°C. que para las incubadas a +37°C. (p<0,001), independientemente de cual fuera el tratamiento de conservación aplicado al semen (**Figura 18**).

El porcentaje de endósmosis positiva experimentó una cinética a lo largo del tiempo muy similar a la seguida por la motilidad, decreciendo de una forma más rápida en las muestras seminales cultivadas a +39°C. (**Figura 19**).

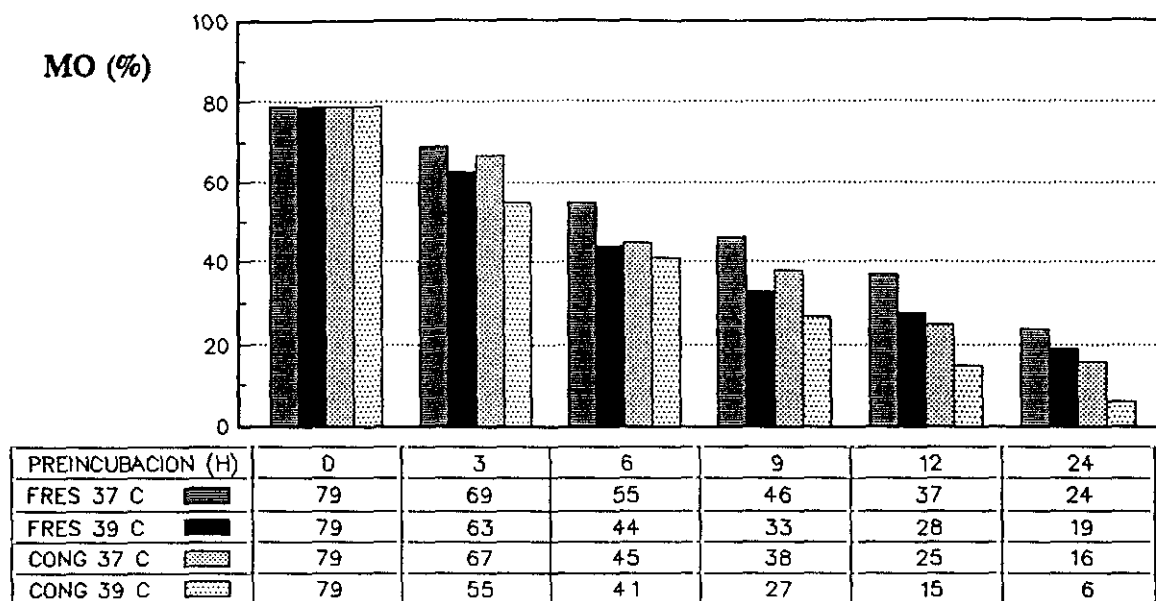


FIGURA 18: Evolución de la motilidad dependiendo del sistema de conservación del semen y de la temperatura de preincubación del mismo.

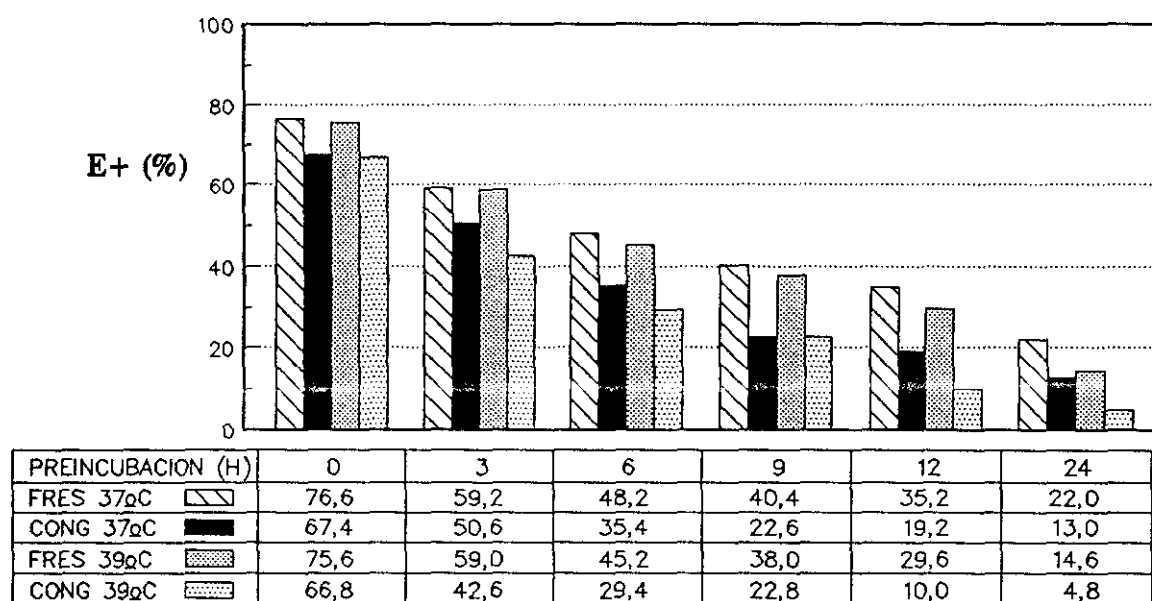


FIGURA 19: Evolución del porcentaje de endósmosis positiva dependiendo del sistema de conservación del semen y de la temperatura de preincubación del mismo.

En la **figura 20** se aprecia la evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto para los cuatro tratamientos seminales realizados. La incubación del semen a $+39^{\circ}\text{C}$. provoca la alteración de la viabilidad celular de una forma más acelerada que a $+37^{\circ}\text{C}$. ($p<0,001$). Este descenso de la tasa de espermatozoides viables con acrosoma intacto es más acentuado cuando las muestras de las cuales proceden las células espermáticas son congeladas ($p<0,001$).

En relación al porcentaje de espermatozoides que presentan reacción acrosómica, puede observarse en la **figura 21** que la proporción máxima de células espermáticas vivas sin acrosoma, en el semen refrigerado, se obtiene en intervalos de tiempo anteriores cuando la temperatura de cultivo es de $+39^{\circ}\text{C}$. Asimismo, en las muestras refrigeradas, la mayor proporción de espermatozoides reaccionados se obtiene a las 6 y a las 9 horas de incubación a las temperaturas de $+37$ y $+39^{\circ}\text{C}$., respectivamente. Por otro lado, cuando las muestras son congeladas, el mayor porcentaje de células espermáticas reaccionadas se alcanza a las 0 horas de incubación para las dos temperaturas estudiadas, presentándose siempre valores superiores a $+39^{\circ}\text{C}$. (33%) que a $+37^{\circ}\text{C}$. (30%). En esta misma figura se puede apreciar en esta misma figura que a partir de las 0 horas de incubación los valores obtenidos para este parámetro son siempre inferiores ($p<0,001$) en las muestras cultivadas a $+39^{\circ}\text{C}$. Para este porcentaje de reacción acrosómica existe una interacción significativa entre la temperatura y el tipo de tratamiento al cual sometemos el semen ($p<0,001$), siendo las muestras preincubadas a $+39^{\circ}\text{C}$. las que presentan un descenso más rápido en estos valores.

En la **figura 22** podemos apreciar que la proporción de células espermáticas muertas sin acrosoma aumenta de forma más rápida en las muestras incubadas a $+39^{\circ}\text{C}$. ($p<0,01$), independientemente del método de conservación del semen aplicado.

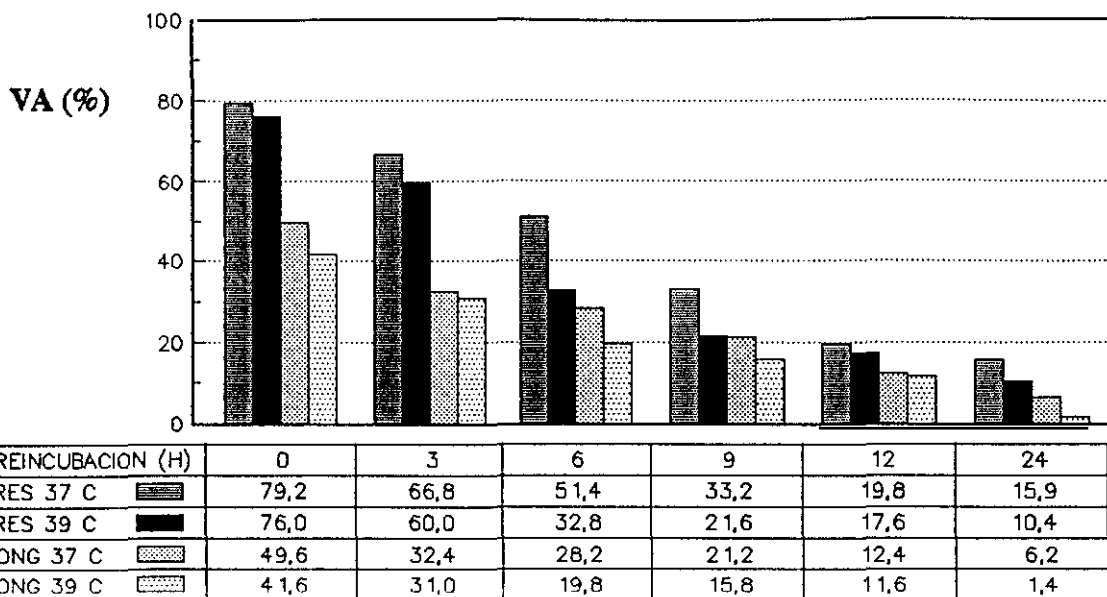


FIGURA 20: Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma normal dependiendo del sistema de conservación del semen y de la temperatura de preincubación del mismo.

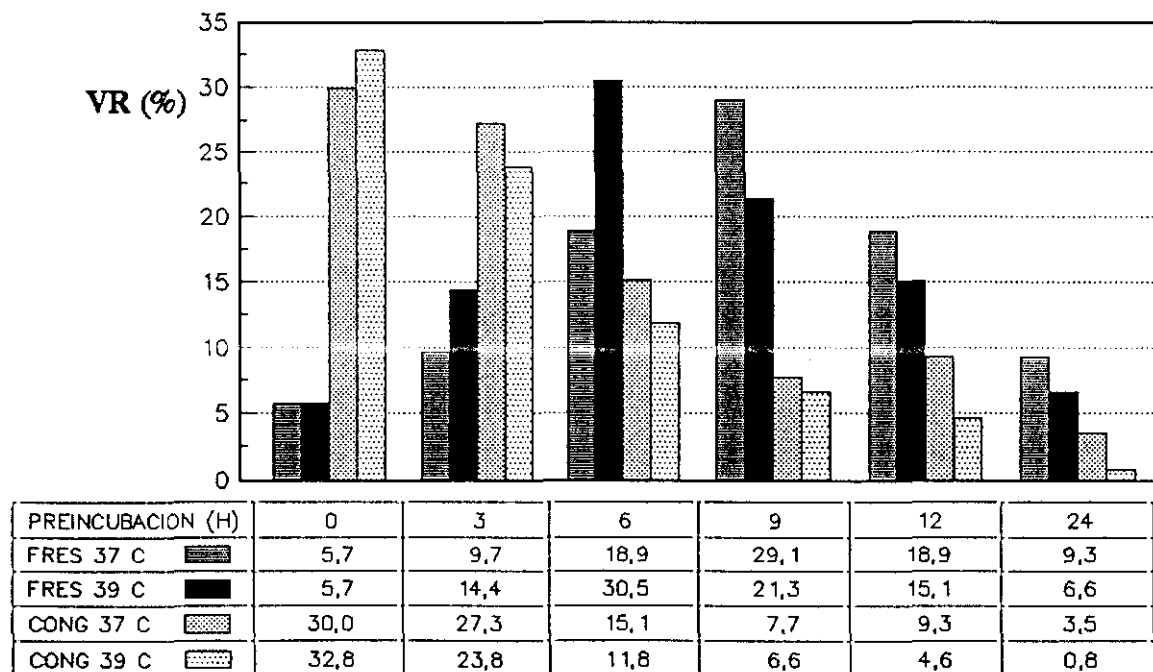


FIGURA 21: Evolución del porcentaje de reacción acrosómica dependiendo del sistema de conservación del semen y de la temperatura de preincubación del mismo

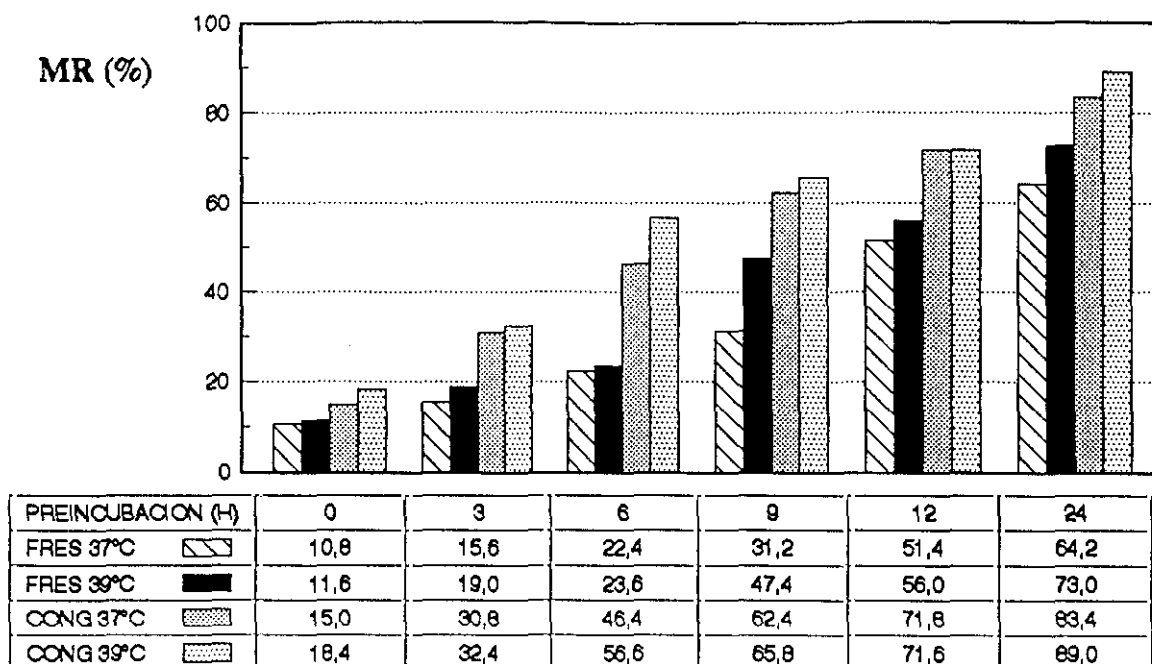


FIGURA 22: Evolución del porcentaje de espermatozoides muertos sin acrosoma dependiendo del sistema de conservación del semen y de la temperatura de preincubación del mismo.

Los efectos de la temperatura de preincubación sobre los resultados del test de hámster, para semen refrigerado y congelado, se evidencian en las **figuras 23 y 24**. En cuanto al porcentaje de penetración (**Figura 23**) podemos apreciar, en las dosis congeladas, los mayores valores a las 0 horas de incubación, siendo superiores dichos valores a +39°C. que a +37°C (84,4 *versus* 74,1). Por el contrario, en las dosis refrigeradas, los máximos porcentajes de fertilización se encuentran a las 6 y a las 9 horas de incubación a temperaturas de +39 y +37°C., respectivamente. Del estudio de esta figura se deduce la existencia de una mayor celeridad en la aparición de altas tasas de penetración para las muestras incubadas a +39°C.

La temperatura de +39°C. también va a acelerar la presentación de mayores tasas de ovocitos poliespérmicos a lo largo de toda la preincubación (**FIGURA 24**).

Se aprecia claramente la interacción existente entre la temperatura de preincubación y el tipo de tratamiento aplicado al semen para los dos parámetros analizados en último lugar ($p < 0,001$).

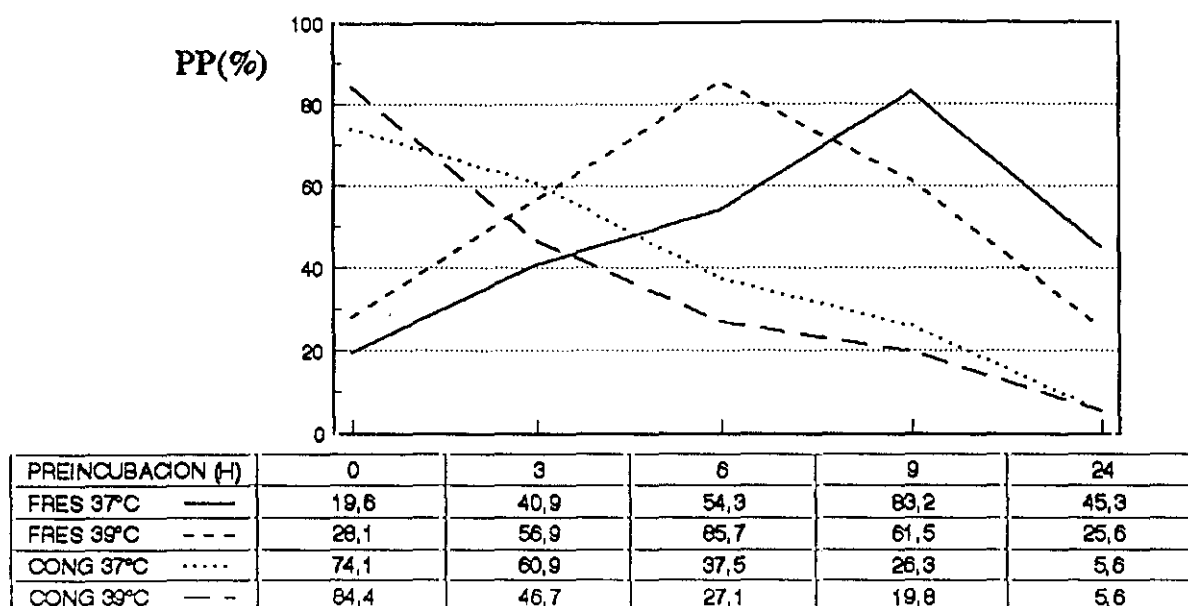


FIGURA 23: Evolución del porcentaje de penetración de ovocitos de hámster dependiendo del método de conservación del semen y de la temperatura de preincubación del mismo.

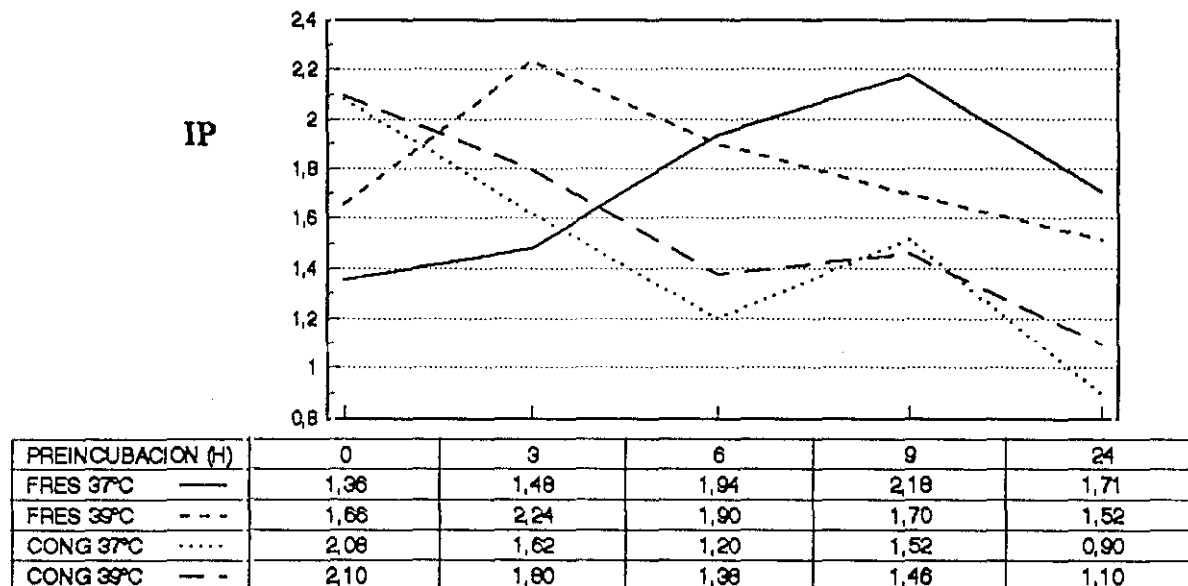


FIGURA 24: Evolución del índice de penetración dependiendo del método de conservación del semen y de la temperatura de preincubación del mismo.

4.2. INCIDENCIA DEL FACTOR INDIVIDUAL SOBRE LA REACCION ACROSOMICA "IN VITRO" EN EL SEMEN CONGELADO DE MORUECO. EFECTOS SOBRE LA FERTILIDAD.

En la **tabla 7** se refleja el análisis de varianza correspondiente a las medias de todos los datos obtenidos tras la preincubación del semen de los moruecos empleados.

TABLA 7. Efecto del factor individuo sobre la fisiología espermática (*).

Nº MACHO	MI	VA	VR	MA	MR
1	48,3 ^A	37 ^a	12,6 ^b	8,1 ^c	41,0 ^b
2	45,8 ^{AB}	40,8 ^b	9,5 ^c	8,9 ^c	39,3 ^b
3	42,7 ^B	22,8 ^c	12,6 ^b	11,5 ^b	50,6 ^a
4	43 ^B	18,5 ^d	14,6 ^a	13,9 ^a	50,4 ^a
5	46,5 ^A	30,1 ^c	12 ^b	13,8 ^a	42,7 ^b

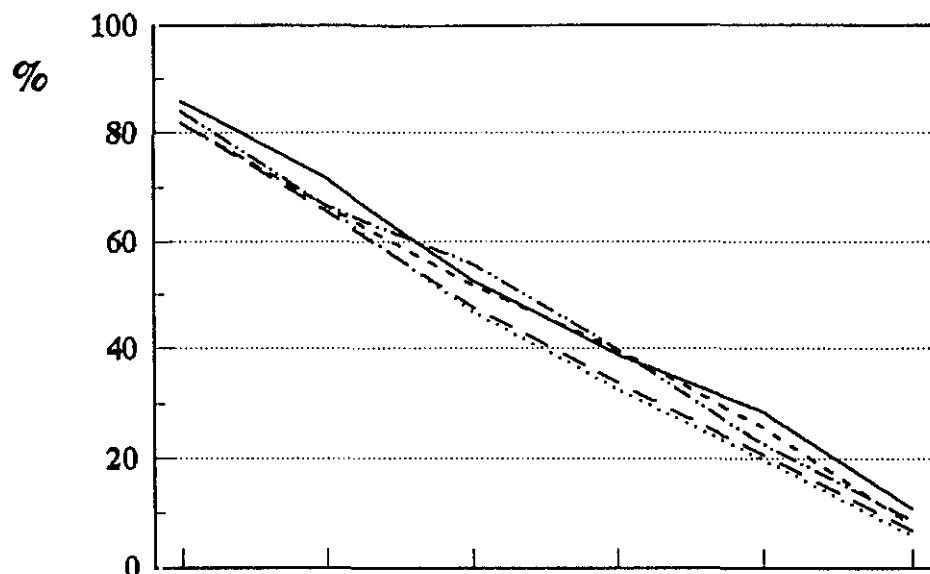
Grupos con idéntico índice dentro de cada columna no son significativamente diferentes: ^{a,b,c,d} ($p < 0,001$) y ^{A,B,C,D} ($p < 0,01$).

(*) Todos los datos están expresados en porcentajes.

En las **figuras 25, 26, 27, 28 y 29** puede apreciarse la evolución de la calidad seminal desde las 0 hasta las 24 h. de preincubación.

En la **figura 25** se representa la evolución de la motilidad espermática a lo largo del tiempo. Como puede observarse este parámetro decrece con el tiempo de incubación en los cinco machos analizados ($p < 0,001$).

Sin embargo, no existe interacción ($p > 0,05$) entre el macho y el tiempo de preincubación para esta medida, ello indica que la motilidad espermática evoluciona de forma paralela en los cinco sementales estudiados.

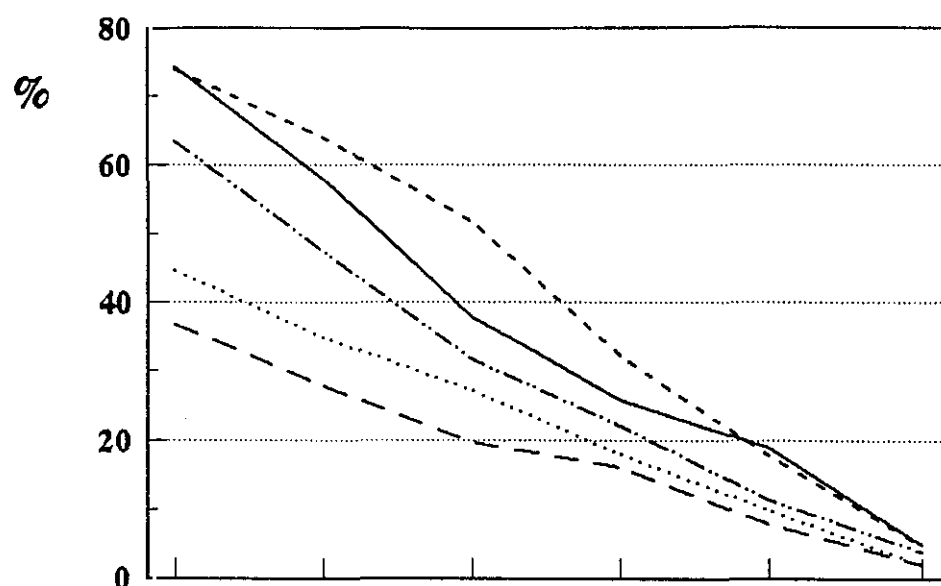


PREINCUBACIÓN (h)	0	3	6	9	12	24
MACHO 1 —————	86	72	53	39	29	11
MACHO 2 - - - - -	82	67	52	40	26	8
MACHO 3	82	67	47	33	20	6
MACHO 4 - - - - -	82	66	48	34	21	7
MACHO 5 - · - · - ·	84	67	56	40	23	9

FIGURA 25: Evolución del porcentaje de motilidad, durante el periodo de preincubación analizado, dependiendo de la resistencia individual a los procesos de congelación-descongelación.

La proporción de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (**Figura 26**) a lo largo del periodo de preincubación reflejó diferencias significativas ($p < 0,01$) para los cinco sementales estudiados, en todos ellos se observa una disminución ($p < 0,001$) en este porcentaje con el progresivo aumento del tiempo de preincubación. En esta misma figura se evidencia que este descenso en la proporción de espermatozoides vivos con acrosoma intacto no se produce de forma uniforme en todos los sementales, lo cual nos indica la existencia de una interacción ($p < 0,001$) entre el tiempo de preincubación del semen y el morueco del cual procede el mismo.

La evolución del porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma íntegro se muestra en la **figura 27**. Esta subpoblación espermática se mantiene en unos valores muy próximos para los cinco sementales analizados, existiendo diferencias significativas ($p < 0,001$) entre algunos machos, como se observa en la **tabla 7**. Este parámetro sigue una cinética muy similar, a lo largo del tiempo de preincubación, para todos los machos contrastados ($p > 0,05$).



PREINCUBACION (h)	0	3	6	9	12	24
MACHO 1 ———	74,4	58,2	38,0	26,0	19,0	5,0
MACHO 2 - - - - -	74,0	64,2	51,8	32,4	17,8	4,8
MACHO 3	44,6	35,0	27,2	18,0	10,0	2,0
MACHO 4 - - - - -	36,8	28,0	19,8	16,2	8,0	2,0
MACHO 5 - - - - -	63,6	47,4	31,8	22,2	11,6	3,8

FIGURA 26: Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, durante el periodo de preincubación analizado, dependiendo de la resistencia individual a los procesos de congelación-descongelación.

El porcentaje de reacción acrosómica tras la preincubación de las muestras seminales congeladas procedentes de los cinco moruecos empleados en este estudio se observa en la **figura 28**. Existen diferencias significativas entre moruecos ($p < 0,001$) en los resultados obtenidos para este parámetro. En general, los cinco sementales analizados podrían incluirse en tres grandes grupos: machos con cinética del reacción acrosómica típica del semen congelado, machos con evolución de la tasa de espermatozoides reaccionadas típica del semen refrigerado y machos que presentan una situación intermedia. En la **figura 28** se evidencia la existencia de interacción ($p < 0,001$) entre el macho del cual procede el semen y el tiempo de incubación del mismo sobre los porcentajes de reacción acrosómica. Así, mientras que en algunos moruecos (machos nº 3 y 4) la proporción de espermatozoides que presentan reacción acrosómica va a ir disminuyendo paulatinamente con el transcurso del tiempo de preincubación espermática; en otros, este factor va a presentar unos valores mínimos a las 0 horas, máximos entre las 6 y las 9 h., para luego descender hasta las 24 h.

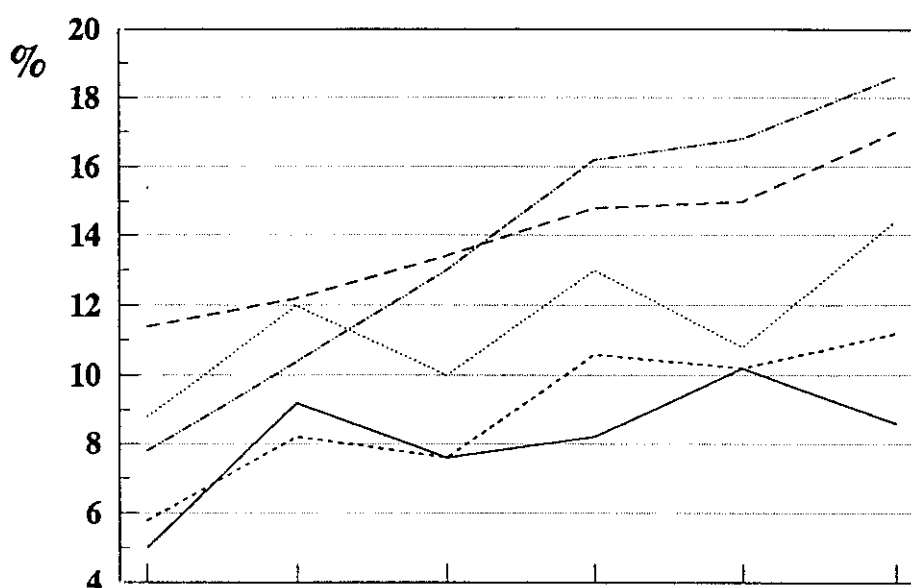
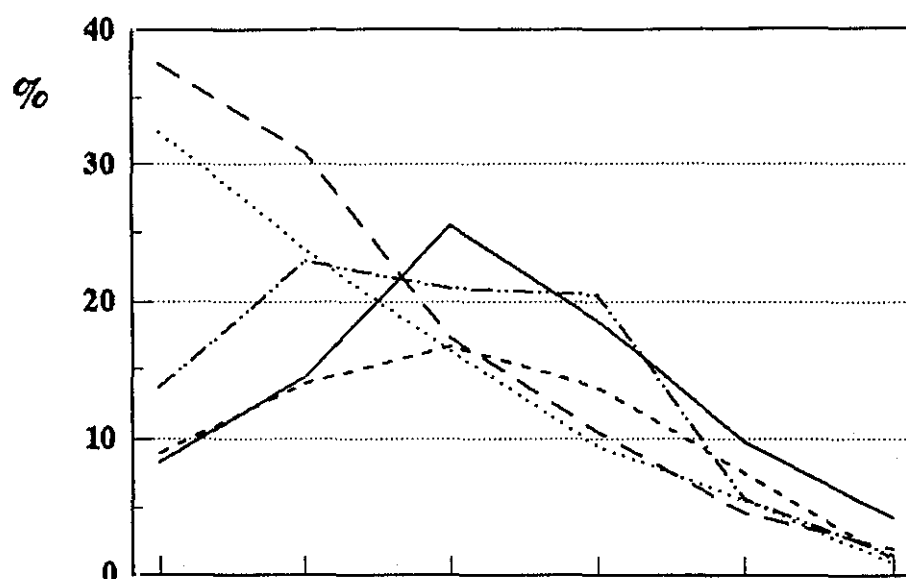


FIGURA 27: Evolución del porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto, durante el periodo de preincubación analizado, dependiendo de la resistencia individual a los procesos de congelación-descongelación.

Los porcentajes de espermatozoides muertos sin acrosoma se muestran en la **figura 29**. Esta categoría espermática aumenta significativamente con el transcurso del tiempo de incubación ($p < 0,001$). El incremento de este tipo de células espermáticas no se produce de forma homogénea en los cinco machos analizados, ello indica la existencia de interacción ($p < 0,001$) entre el tiempo de preincubación y el semental donante de las muestras, para este parámetro.

En la **tabla 8** se muestran los resultados de fertilidad obtenidos tras la aplicación de las dosis congeladas de los cinco moruecos sometidos a este estudio, observándose diferencias en la fertilidad ($p < 0,01$) en los sementales estudiados.



PREINCUBACION (h)	0	3	6	9	12	24
MACHO 1 ———	8,30	14,45	25,53	18,60	9,90	4,30
MACHO 2 - - - - -	9,0	14,0	16,7	13,7	7,6	1,2
MACHO 3	32,50	23,80	16,30	9,45	5,60	0,80
MACHO 4 - - - .	37,8	31,0	17,3	10,5	4,7	1,8
MACHO 5 - - - - -	13,7	23,0	21,0	20,5	5,7	1,5

FIGURA 28: Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma, durante el periodo de preincubación analizado, dependiendo de la resistencia individual a los procesos de congelación-descongelación.

TABLA 8. Resultados de fertilidad con semen congelado.

Nº MACHO	OVEJAS I.A.	OVEJAS PARIDAS	FERTILIDAD (%)
1	23	14	60,1 ^a
2	24	10	41,6 ^b
3	24	5	20,8 ^c
4	24	3	12,5 ^c
5	24	10	41,6 ^b

^{a, b, c}: grupos con idéntico índice dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

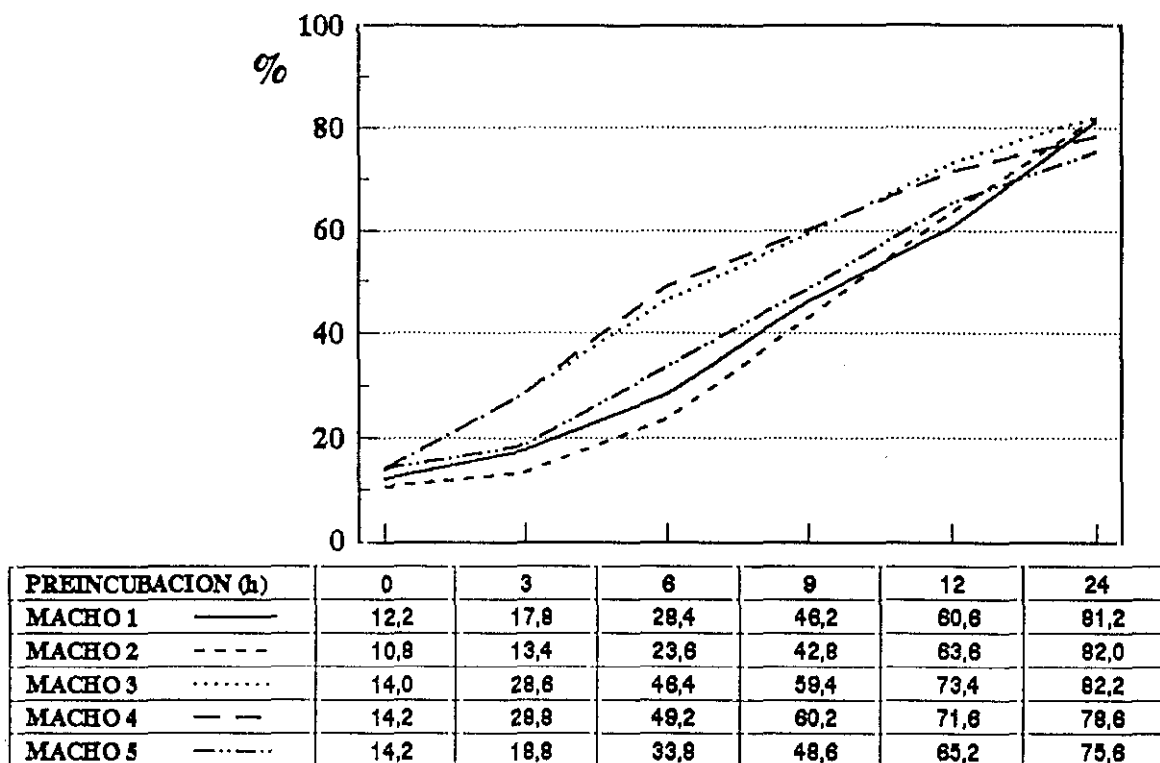


FIGURA 29: Evolución del porcentaje de espermatozoides muertos sin acrosoma, durante el periodo de preincubación analizado, dependiendo de la resistencia individual a los procesos de congelación-descongelación.

En las tablas 9 a 14, se muestran los coeficientes de correlación obtenidos tras la asociación de los parámetros seminales analizados en los distintos intervalos de tiempo con el sistema de FIV heterólogo. Se observan correlaciones positivas elevadas entre el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto a las 0 y 3 horas de preincubación y el porcentaje de penetración de ovocitos de hámster ($r = 0,80$ y $r = 0,73$, respectivamente). Así como elevadas correlaciones negativas entre éste último parámetro y el porcentaje de reacción acrosómica para los mismos tiempos de preincubación ($r = -0,81$ y $r = -0,69$, respectivamente). No existen correlaciones significativas entre el PP y la motilidad analizada en cualquiera de los tiempos estudiados.

La proporción de espermatozoides muertos sin acrosoma con respecto al sistema de FIV presenta coeficientes de correlación negativos para todas las horas analizadas, a excepción de a las 24 horas, donde el valor de r en este caso es de 0,05 ($p < 0,01$).

TABLA 9. Correlaciones entre parámetros seminales analizados a las 0 h. de preincubación y poder fecundante "in vitro" en semen congelado de morueco.

	VA ₀	VR ₀	MR ₀	MO ₀
PP	0,80	- 0,81	- 0,20	0,35
significación	**	**	ns	ns

Niveles de significación: ** (p< 0,01), * (p< 0,05), ns no significativo.

TABLA 10: Correlaciones entre parámetros seminales analizados a las 3 h. de preincubación y poder fecundante "in vitro" en semen congelado de morueco.

	VA ₃	VR ₃	MR ₃	MO ₃
PP	0,73	- 0,69	- 0,57	0,36
significación	**	**	*	ns

Niveles de significación: ** (p< 0,01), * (p< 0,05), ns no significativo.

TABLA 11: Correlaciones entre parámetros seminales analizados a las 6 h. de preincubación y poder fecundante "in vitro" en semen congelado de morueco.

	VA ₆	VR ₆	MR ₆	MO ₆
PP	0,51	0,58	- 0,60	0,26
significación	*	*	**	ns

Niveles de significación: ** (p< 0,01), * (p< 0,05), ns no significativo.

TABLA 12: Correlaciones entre parámetros seminales analizados a las 9 h. de preincubación y poder fecundante "in vitro" en semen congelado de morueco.

	VA ₉	VR ₉	MR ₉	MO ₉
PP	0,49	0,63	- 0,29	0,28
significación	**	**	ns	ns

Niveles de significación: ** (p< 0,01), * (p< 0,05), ns no significativo.

TABLA 13: Correlaciones entre parámetros seminales analizados a las 12 h. de preincubación y poder fecundante "in vitro" en semen congelado de morueco.

	VA ₁₂	VR ₁₂	MR ₁₂	MO ₁₂
PP	0,50	0,48	- 0,54	0,41
significación	*	*	*	ns

Niveles de significación: ** (p< 0,01), * (p< 0,05), ns no significativo.

TABLA 14: Correlaciones entre parámetros seminales analizados a las 24 h. de preincubación y poder fecundante "in vitro" en semen congelado de morueco.

	VA ₂₄	VR ₂₄	MR ₂₄	MO ₂₄
PP	0,38	0,47	0,05	0,30
significación	ns	*	ns	ns

Niveles de significación: ** (p< 0,01), * (p< 0,05), ns no significativo.

4.3. CORRELACIONES ENTRE ANALITICA DE LABORATORIO Y PRUEBAS DE FERTILIDAD.

En la **tabla 15** se refleja el análisis de varianza correspondiente a las medias de todos los datos obtenidos inmediatamente después de descongelar (0 horas postdescongelación). Se observa una gran variabilidad individual ($p < 0,001$) entre los distintos moruecos para los parámetros seminales analizados.

A las 6 y 24 horas postdescongelación (**TABLAS 16 Y 17**) también se aprecian diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los sementales en las características contrastadas.

TABLA 15: Variabilidad individual de los parámetros seminales analizados a las 0 horas post-descongelación en semen de morueco congelado (*).

MAC	FMP	FMR	E+	NAR	PP	IP	FMP60
A	61 ^A	3,8 ^A	60,0 ^A	46,2 ^A	77,9 ^A	2,02 ^A	54,6 ^A
B	52 ^B	3,6 ^{AB}	51,6 ^B	43,0 ^B	48,5 ^B	1,66 ^B	35,9 ^B
C	47 ^C	3,1 ^C	37,8 ^C	40,0 ^{BC}	23,49 ^C	1,47 ^C	30,3 ^{BC}
D	45 ^C	3,3 ^{BC}	35,0 ^C	37,8 ^C	26,45 ^C	1,51 ^{CB}	23,2 ^D
E	40 ^{BC}	3,7 ^A	50,0 ^B	49,0 ^A	43,21 ^B	1,53 ^{CB}	40,9 ^B

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p < 0,001$).

(*) Todos los datos se expresan en porcentaje a excepción de FMR e IP.

TABLA 16: Variabilidad individual de los parámetros seminales analizados a las 6 horas post-descongelación en semen de morueco congelado (*).

MACH	FMP	FMR	E+	NAR	FMP60
A	50 ^A	3,6 ^A	55,0 ^A	43,0 ^A	45,8 ^A
B	36 ^B	3,2 ^{BA}	46,4 ^B	38,6 ^B	27,1 ^C
C	38 ^B	2,9 ^C	32,6 ^C	37,6 ^B	21,4 ^C
D	37 ^B	3,0 ^{CB}	30,4 ^C	36,2 ^B	14,5 ^D
E	42 ^C	3,4 ^A	44,6 ^B	42,4 ^A	32,1 ^{BC}

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p < 0,001$). (*) Todos los datos se expresan en porcentaje a excepción de FMR.

TABLA 17: Variabilidad individual de los parámetros seminales analizados a las 24 horas post-descongelación en semen de morueco congelado (*).

MACH	FMP	FMR	E+	NAR	FMP60
A	41 ^A	3,0 ^A	46,2 ^A	35,8 ^A	36,6 ^A
B	26 ^B	2,9 ^A	37,0 ^B	34,0 ^A	17,9 ^C
C	26 ^B	2,4 ^B	26,2 ^C	31,0 ^{AB}	12,2 ^C
D	29 ^B	2,6 ^B	26,0 ^C	27,8 ^B	10,3 ^C
E	34 ^C	2,7 ^{AB}	40,0 ^B	37,8 ^A	22,9 ^B

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p < 0,001$).

(*) Todos los datos se expresan en porcentaje a excepción de FMR.

Esta variabilidad individual en la calidad seminal queda puesta de manifiesto también en cuanto a los resultados de fertilidad obtenidos al aplicar semen refrigerado y congelado de los cinco sementales en estudio (TABLA 18).

TABLA 18: Resultados de fertilidad obtenidos tras la aplicación de semen refrigerado y congelado de morueco.

macho n°	Semen Refriger.		Semen Congelad.	
	ovejas IA	fertil.	ovejas IA	fertil.
A	6	50,0 ^C	23	60,1 ^A
B	6	33,3 ^D	24	41,6 ^B
C	6	50,0 ^C	24	20,8 ^C
D	6	66,6 ^B	24	12,5 ^C
E	6	83,3 ^A	24	41,6 ^B

(A, B, C) Valores dentro de cada columna con idéntico superíndice no difieren significativamente ($p < 0,01$).

En la siguiente tabla (TABLA 19) se aprecia claramente que el PP de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida clasifica a los sementales estudiados en el mismo orden que la fertilidad que se obtiene de ellos.

TABLA 19: Aproximación entre tasas de fertilidad "in vitro" y porcentaje de penetración de ovocitos de hámster.

macho n°	fert. Congelado	PP
A	60,1 ^A	77,9 ^A
B	41,6 ^B	48,5 ^B
C	20,8 ^C	23,5 ^C
D	12,5 ^C	26,4 ^C
E	41,6 ^B	43,2 ^B

(A, B, C): Valores dentro de cada columna con idéntico superíndice no difieren significativamente ($p < 0,01$).

De esta tabla se puede deducir una clasificación de los cinco sementales en función del PP obtenido tras la aplicación de sus dosis congeladas "in vitro"; dicha clasificación distingue a los sementales en función de la fertilidad obtenida al aplicar sus dosis "in vivo"; así los tres grupos resultantes serían:

- Grupo 1: PP < 40% = animales de fertilidad baja
- Grupo 2: 40% < PP < 70% = animales de fertilidad media
- Grupo 3: PP > 70% = animales de fertilidad alta

En la **tabla 20** se reflejan los resultados del análisis de discriminancia realizado mediante el cual podemos incluir una dosis de semen en función de diferentes parámetros seminales en alguno de los tres grupos anteriores. Se trata de ver qué parámetro seminal clasifica las dosis de semen con mayor exactitud en función del PP.

TABLA 20: Resultados del análisis de discriminancia. Porcentaje de casos de las tres categorías de PP previamente establecidas, correctamente clasificados según el resto de parámetros seminales empleados y fiabilidad de la misma.

	W.L.	sign.	Gr.1	Gr.2	Gr.3	T
MO	0,90	n.s.	40	0	60	28
VA	0,15	***	100	70	60	80
VR	0,08	***	100	60	100	84
NAR	0,52	***	100	20	80	64
FMP 60	0,52	***	60	50	80	60
E+	0,17	***	100	50	100	80

nivel significación: n.s. (no significativo), *** ($p < 0,001$).

W.L.:Wilk's Lambda.

Gr1: casos de PP englobados dentro del grupo 1 clasificados correctamente por los parámetros analizados.

Gr2: casos de PP englobados dentro del grupo 2 clasificados correctamente por los parámetros analizados.

Gr3: casos de PP englobados dentro del grupo 3 clasificados correctamente por los parámetros analizados.

T: casos totales de PP clasificados correctamente por los parámetros seminales analizados.

En esta tabla, se reflejan los porcentajes de los casos estudiados de PP clasificados correctamente por los parámetros seminales estudiados en su totalidad (T), así como los clasificados de un modo exacto dentro de cada grupo de PP establecido aleatoriamente en este trabajo (Gr1, Gr2, Gr3). El parámetro que mejor clasifica los valores correspondientes a los distintos grupos es el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados existente a las 0 h. postdescongelación y el que más se aleja de esta aproximación es el porcentaje de motilidad obtenido nada más descongelar las dosis. VR presenta el menor de valor de Wilk's Lambda, por lo tanto, este parámetro es el que mayor separación determina entre los tres grupos preestablecidos de PP; mientras que la motilidad presenta un Wilk's Lambda de 0,9 indicando esto que la separación entre los tres grupos de PP determinada por este parámetro es muy dudosa. Los Wilk's Lambda correspondiente a VA y E+ son bastante bajos, estableciéndose, por tanto, su exactitud para clasificar correctamente una dosis seminal en función de su poder fecundante. Finalmente, los Wilk's Lambda de NAR y FMP60 son intermedios entre los mencionados anteriormente, siendo por tanto estimaciones que van a tener un poder medio en cuanto a su capacidad para definir el poder fecundante de una dosis seminal.

En la **tablas 21, 22, 23** se reflejan los coeficientes de correlación lineal obtenidos al enfrentar las variables analizadas a las 0, 3, y 6 horas postdescongelación, respectivamente, con los resultados de la prueba de penetración espermática y con el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto determinado por la T.S.T.

TABLA 21: Relación entre PP, IP y VA y los parámetros seminales analizados a las 0 Hrs. post-descongelación.

	FMP	FMR	E+	NAR	FMP 60
PP	0,58**	0,49*	0,86**	0,53*	0,74*
IP	0,66*	0,18	0,53*	0,25	0,50*
V.A.	0,53*	0,47*	0,85**	0,59*	0,75**

* (p<0,05); ** (p<0,01)

TABLA 22: Relación entre PP, IP y VA y los parámetros seminales analizados a las 6 Hrs. post-descongelación.

	FMP	FMR	E+	NAR	FMP 60
PP	0,57*	0,61**	0,85**	0,58**	0,75**
IP	0,58*	0,18	0,58*	0,22	0,47*
V.A.	0,36	0,41	0,83**	0,52*	0,65**

* (p<0,05); ** (p<0,01)

TABLA 23: Relación entre PP, IP y VA y los parámetros seminales analizados a las 24 Hrs. post-descongelación.

	FMP	FMR	E+	NAR	FMP 60
PP	0,67**	0,49*	0,83**	0,50*	0,81**
IP	0,70**	0,36	0,56*	0,12	0,68**
V.A.	0,39	0,48*	0,78**	0,54*	0,62**

* (p<0,05); ** (p<0,01)

En estas tablas, se observan correlaciones altamente significativas entre el PP y VA y los porcentajes de E+ obtenidos a las 0, 6 y 24 horas post-descongelación. A su vez fue alta la correlación entre PP y VA y FMP60 en los tres tiempos analizados.

Mientras que el grado de asociación entre estos parámetros con la motilidad y con la integridad del acrosoma fué siempre inferior al citado para las pruebas anteriores.

5. DISCUSSION

5. DISCUSION

5.1. SOBRE LOS EFECTOS DE LOS PROCESOS DE CONGELACION EN LA FISIOLOGIA ESPERMATICA "IN VITRO".

Las bajas tasas de fertilidad que acompañan normalmente a la inseminación artificial ovina con semen congelado han sido referidas por numerosos autores (Salamon y Visser, 1974; Graham et al., 1978; 1984), sin embargo, hasta hace pocos años no se han estudiado a fondo las posibles causas de estos resultados tan desfavorables. A partir de entonces, los bajos porcentajes de gestación asociados al empleo de semen congelado de morueco han sido explicados por diversos motivos, entre los cuales se destacan: el daño originado en la estructura acrosomal de las células espermáticas criopreservadas (Tasserón et al., 1977), la reducida viabilidad de dichas células en el tracto genital femenino (Mattner et al., 1969), las alteraciones del transporte espermático (Lighfoot y Salamon, 1970; Armstrong y Evans, 1984), y por último el efecto tóxico originado por algunos crioprotectores como el glicerol, sobre la célula espermática (Slavik, 1987; Abdelhakeam, 1988). En cualquier caso, cuando una muestra seminal es congelada y descongelada un gran número de espermatozoides aparecen fuertemente dañados y por tanto, afuncionales. Sin embargo, se sabe que las células que superan estos procesos pueden presentar su fisiología alterada, hecho por el cual pueden explicarse resultados de fertilidad tan desfavorables al aplicar semen congelado de morueco por vía cervical.

Nuestros resultados muestran diferencias significativas ($p < 0,001$) en todos los parámetros seminales analizados, para el estudio de la fisiología espermática, en función del método de conservación seminal aplicado, a excepción del porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto. Estas diferencias se traducen en una disminución más rápida de la viabilidad celular y en la presentación de un estado de capacitación prematuro en las muestras congeladas. Ello hace que las células espermáticas congeladas, estén preparadas para fertilizar inmediatamente después de la descongelación (PP= 79,2%), mientras que las refrigeradas necesitan un tiempo de capacitación de 9 horas para presentar unos valores de penetración (PP= 72,3%) similares a las anteriores.

Estos hechos han sido descritos también por otros autores en otras especies (Slavik, 1987; Crittser et al., 1987; Berg et al., 1990), atribuyéndose la presentación de este estado prematuro de capacitación a diversos motivos como son:

la acción tóxica del glicerol (Slavik, 1987), el efecto capacitante del TES y del Tris (Berg et al., 1990) o al choque térmico frío y a la dilución del semen (Watson, 1990). Otros autores como Crittser et al. (1987) sostienen que este efecto, en espermatozoides humanos, se debe únicamente a los procesos de congelación-descongelación. Nuestros resultados, en semen de morueco, están en la línea de estos últimos autores, ya que según quedó reflejado en el diseño experimental la única diferencia entre las dos muestras seminales es la congelación-descongelación, diluyéndose y manejándose las dos alíquotas de idéntica forma antes y después de dicho proceso. Watson (1990) indica que las lesiones originadas por la congelación en la estructura de las membranas celulares son las responsables de estas alteraciones en la fisiología de la célula espermática. Según este autor, la dilución del semen va a desencadenar una entrada masiva de calcio al interior celular, siendo este influjo proporcional al grado de dilución. Cuando los espermatozoides se mantienen a temperaturas de entre +25 y +39 °C el exceso de este catión es eliminado al exterior por unas proteínas transportadoras denominadas "bombas de calcio", pero cuando estas proteínas han sido dañadas, por ejemplo durante la congelación, no van a presentar actividad acumulándose el calcio en el interior de la célula. Este hecho va a desencadenar la fusión entre la membrana plasmática y la acrosomal externa de una forma prematura, es decir, se origina una reacción acrosómica acelerada.

Todos los trabajos referidos anteriormente han empleado sistemas de FIV para determinar los efectos de la congelación sobre la fisiología espermática. Según indica Yanagimachi (1988) esto puede falsear los resultados obtenidos ya que, aunque la existencia de elevadas tasas de penetración "in vitro" indica obligatoriamente, que la capacitación se ha efectuado correctamente, cuando la FIV fracasa no necesariamente debe atribuirse a un fallo en el sistema de capacitación, pues existen otros muchos factores (ovocitos, medios de cultivo, condiciones de cocultivo) que también intervienen en estos procesos. Por ello, los sistemas de FIV, no deben utilizarse como único método para contrastar los efectos de la congelación sobre la reacción acrosómica, por todo ello nosotros hemos empleado dos técnicas (SPA y TST) para evaluar la evolución del porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma durante todo el periodo de incubación. Nuestros resultados, sin embargo, revelan la existencia de porcentajes similares de reacción acrosómica determinadas por ambas técnicas en los cinco replicados realizados. Ello puede explicarse en base a que cuando las concentraciones espermáticas en el cocultivo del sistema de FIV son bajas, como en nuestro trabajo (100.000 sperm./ml.) el porcentaje de espermatozoides que sufre reacción acrosómica se va a reflejar directamente sobre el porcentaje de penetración de ovocitos de hámster, mientras que cuando se trabaja con concentraciones de espermatozoides muy elevadas, los porcentajes de reacción

acrosómica encontrados no van a diferenciar distintos grados de penetración espermática, ya que al existir espermatozoides en abundancia siempre habrá espermatozoides reaccionados que fertilicen en cualquier intervalo de tiempo.

Nuestros resultados muestran (**FIGURA 13**) que el porcentaje de reacción acrosómica en las muestras refrigeradas se mantiene constante a partir de las 3 horas de preincubación, disminuyendo más acusadamente el número de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y aumentando el porcentaje de muertos con acrosoma dañado. **Didion y Graves (1986)** indican que la reacción acrosómica es un proceso rápido en el tiempo (10-12 min. para espermatozoides de toro) y que la vida media del espermatozoide reaccionado es corta debido, principalmente, a las condiciones fisiológicas a las que está sometido. Podemos pensar, que los espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado, obtenidos durante las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas de preincubación no son los mismos y que estos espermatozoides aumentan, parcialmente, el porcentaje de espermatozoides muertos sin acrosoma. Además, el hecho de que el porcentaje de espermatozoides vivos que están sufriendo o han sufrido la reacción acrosómica sea casi constante durante la preincubación, apoya la hipótesis de muchos autores sobre la asincronía o presentación escalonada de este proceso en un mismo eyaculado, ya sea "in vivo" o "in vitro" (**Yanagimachi, 1988**). La reacción acrosómica es sincrónica únicamente en espermatozoides de animales inferiores cuando están expuestos al ovocito, ya que se ha demostrado un factor inductor de la reacción acrosómica en estos animales (**Kinsey et al., 1979**) o en espermatozoides de animales superiores cuando se emplean potentes inductores (como ionóforos del calcio), aunque se desconoce si el empleo de estas sustancias puede tener un efecto negativo. En la **figura 14** se representa la evolución de los cuatro tipos de espermatozoides determinados por la T.S.T. en el semen congelado, observándose que la cinética de presentación de la reacción acrosómica es totalmente distinta a la del semen refrigerado (**FIGURA 15**), siendo en este caso una reacción acrosómica de tipo sincrónico entre las 0 y las 3 horas de preincubación, disminuyendo notablemente desde aquí hasta el final del periodo de incubación. Además en estas dos figuras se observa que la fisiología de los espermatozoides congelados implica un envejecimiento de 6 horas con respecto a los refrigerados.

Esta presentación brusca de R.A. en el inicio de la preincubación, hace que las posibilidades de fertilización "in vitro" en el semen congelado se reduzcan notablemente con respecto al semen refrigerado, existiendo una diferencia muy marcada en los patrones de penetración a lo largo del tiempo para ambos grupos. Esta alteración en la cronología óptima de penetración entre semen congelado y refrigerado ha sido ya descrita en espermatozoides de toro (**Wheeler y Seidel, 1986**)

y de hombre (Crittser et al., 1987). Estos autores concluyen que el semen refrigerado requiere tiempos de capacitación superiores al congelado y que éste último pierde su viabilidad y capacidad fecundante "in vitro" de una forma más rápida que el primero.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que los procesos de congelación-descongelación "per se" van a alterar la fisiología espermática en el semen de morueco, originando un estado de capacitación prematuro y una disminución rápida de la viabilidad celular en el tiempo, consecuencia de todo ello es la reducción del poder fecundante "in vitro" del semen congelado de morueco.

También es interesante la discusión sobre el efecto de la temperatura de preincubación y del tratamiento al cual se somete el semen sobre la fisiología espermática "in vitro".

La capacitación espermática es un fenómeno dependiente de la temperatura en algunas especies; mientras que en el murciélago (Lambert, 1981) y en el cobayo (Fleming y Kuehl, 1985) el rango de temperaturas usado para capacitar semen "in vitro" es muy amplio, en el hámster (Mahi y Yanagimachi, 1973) el máximo porcentaje de reacción acrosómica se obtiene mediante el empleo de temperaturas de +40°C. Similarmente, en estudios realizados en otras especies como la porcina (Cheng et al., 1986) y la ovina (Watson et al., 1991) se ha observado que temperaturas de +38,5 a +39°C aceleran la presentación de altos porcentajes de reacción acrosómica. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo están en la misma línea que los reflejados por estos autores. La presentación de la reacción acrosómica en semen de morueco se origina de una forma más rápida cuando los espermatozoides se preincuban a +39°C, independientemente de cual fuera la procedencia de las dosis seminales. Ello acelera la disminución de la viabilidad celular, ya que, las células espermáticas incubadas a estas temperaturas presentan un metabolismo más intenso agotándose antes en el tiempo.

Los porcentajes de motilidad y endósmosis positiva descienden más rápidamente en las muestras sometidas a +39°C que en las incubadas a +37°C, independientemente del tipo de tratamiento aplicado al semen.

La evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto a lo largo del periodo de preincubación también es diferente en función de la temperatura de preincubación, apreciándose una disminución de este parámetro más acentuada cuando las muestras se incuban a +39°C. Este descenso es más

pronunciado en las dosis congeladas que en las refrigeradas ($p < 0,01$). Ello indica que las células espermáticas congeladas son mucho más sensibles que las refrigeradas a las temperaturas elevadas. Estos mismo resultados fueron establecidos por Lighfoot y Salamon (1970) "in vivo" tras la inseminación con semen congelado y refrigerado.

El porcentaje obtenido de reacción acrosómica (por TST o SPA) se acelera cuando las muestras se preincuban a $+39^{\circ}\text{C}$. Existiendo interacción significativa ($p < 0,001$) entre temperatura, tipo de semen y tiempo de preincubación, lo que indica que las variaciones temporales de R.A. fueron diferentes para cada temperatura de incubación y para cada sistema de conservación del semen empleado. Las muestras procedentes de las dosis congeladas preincubadas a $+39^{\circ}\text{C}$ son las que más rápidamente pierden la viabilidad celular.

La influencia de la temperatura sobre la fisiología espermática ha sido atribuida a diversas causas; Flechon et al. (1986) indican que temperaturas de $+39^{\circ}\text{C}$ facilitan la redistribución de las partículas del interior de la membrana. Además estas condiciones también producen otros fenómenos que aceleran el metabolismo espermático y que inducen la capacitación, como son la eliminación más rápida del factor de decapitación y la disminución del cociente colesterol fosfolípidos (Langlais y Roberts, 1985), aumentando las posibilidades de fusión entre las membranas.

5.2. SOBRE LA INCIDENCIA DEL FACTOR INDIVIDUAL EN LA REACCION ACROSOMICA "IN VITRO" EN EL SEMEN DE MORUECO CONGELADO. EFECTOS EN LA FERTILIDAD.

Numerosos trabajos destacan diferencias individuales entre moruecos, en cuanto a los resultados de fertilidad obtenidos mediante el empleo de la monta natural (Mickelsen et al., 1981) y de la inseminación artificial con semen refrigerado (Pérez García et al., 1987) o congelado (Maxwell, 1986).

Cuando el semen es congelado, esta variabilidad se manifiesta también a nivel de la calidad seminal "in vitro" (Aamdal y Andersen, 1968). No obstante, los parámetros analizados normalmente en el laboratorio no permiten establecer realmente el número de células potencialmente viables, es decir, capaces de sufrir capacitación y reacción acrosómica y fusionarse posteriormente con el ooplasma del ovocito.

En este trabajo hemos investigado "in vitro" la evolución en el tiempo de las distintas categorías espermáticas determinadas por la TST en cinco moruecos, así como las repercusiones de estas variaciones individuales en la fertilidad "in vitro" e "in vivo" tras la aplicación de las dosis correspondientes. Hemos encontrado diferencias significativas entre los distintos machos utilizados en las pruebas realizadas "in vitro" en relación a los diferentes parámetros analizados por la TST durante todo el periodo de preincubación.

La cinética de transformación de unas categorías espermáticas en otras según la TST permite clasificar los cinco moruecos estudiados en tres grupos; machos con una cinética propia del semen congelado, sementales con una evolución próxima a la del semen refrigerado y animales que se encuentran en una situación intermedia entre ambas. Por lo tanto, la influencia del factor individuo sobre la fisiología de las células espermáticas que sobreviven a la congelación queda perfectamente evidenciada en nuestro trabajo. Hasta la fecha no hemos encontrado ningún otro estudio sobre este tema, ya que todo lo que se ha realizado ha sido referido a la influencia del factor individuo en la congelabilidad "in vitro" de la totalidad de las células congeladas (García Artiga, 1992). Por lo tanto, nuestros resultados son de difícil comparación con lo que se ha investigado sobre este tema ya que se valoran parámetros distintos no extrapolables.

Las diferencias evidenciadas en nuestro trabajo pueden deberse a variaciones en la concentración de potasio, sodio y ácido cítrico en plasma seminal (Marinov y Dacheva, 1984), a constituciones distintas de los fluidos seminales (Fukui et al., 1988) o a diferencias en los lípidos de la membrana (Graham y Foote, 1987) pudiéndose incluso alterar la relación colesterol:fosfolípidos (Davis, 1980).

Estas variaciones van a repercutir notablemente en las fertilidades "in vitro" e "in vivo". En la Tablas 9 a 14 se muestran los coeficientes de correlación existentes entre los parámetros analizados y el sistema de FIV heterólogo. Como puede observarse, el porcentaje inicial de espermatozoides vivos con acrosoma va a incidir positivamente sobre las tasas de penetración espermática ($r: 0,80, p < 0,01$). A su vez existe una correlación negativa entre el porcentaje inicial de R.A. y el PP de ovocitos de hámster ($r: -0,81, p < 0,01$), ello indica que cuánto mayor sea el porcentaje inicial de R.A. menores van a ser las posibilidades de fertilización. Por lo tanto, en aquellos moruecos que se presente una cinética de espermatozoides reaccionados típica de semen congelado las posibilidades de FIV van a ser muy inferiores las que se den en aquellos otros que se aproximen a lo que ocurre cuando

el semen es refrigerado. Por otra parte, se observa una correlación elevada entre el porcentaje de R.A. a las 6 y 9 horas de preincubación y el test de hámster (r : 0,48 y r : 0,63, respectivamente; $p < 0,01$), ello indica que para que los resultados de FIV sean aceptables la proporción de espermatozoides vivos sin acrosoma debe mantenerse elevada entre las 3 y las 9 h. de preincubación.

En cuanto a las repercusiones de estas variaciones individuales sobre la fertilidad "in vivo", observamos en la **tabla 8**, que los machos que siguen una evolución similar a la del semen refrigerado van a presentar unos valores elevados de fertilidad, mientras que cuando la cinética de VA y VR es la propia de semen congelado, estas tasas de fertilidad van a ser muy inferiores. A pesar de evidenciarse variaciones en fertilidad entre los cinco moruecos analizados éstas no se han podido correlacionar significativamente con las pruebas "in vitro" debido a la falta de datos de fertilidad necesarios para ello.

Las variaciones en la respuesta individual a la congelación en el semen de morueco puestas de manifiesto en nuestro trabajo deberían tenerse muy presentes a la hora de destinar a los sementales a los programas de inseminación artificial.

5.3. SOBRE CORRELACIONES ENTRE ANALITICA DE LABORATORIO Y PRUEBAS DE FERTILIDAD.

La existencia de variaciones individuales en la resistencia a los procesos de congelación por el semen de morueco ha sido puesto de manifiesto por diversos autores (**Marinov y Dacheva, 1984; G^a Artiga, 1992**). Estas variaciones individuales se han obtenido también al emplear la inseminación artificial con semen congelado (**Mawwell, 1986**). Por tanto, la incidencia del factor individual sobre la congelabilidad del semen de morueco, "in vivo" e "in vitro", es un hecho suficientemente conocido. No obstante, el desarrollo de pruebas de laboratorio que sean capaces de anticipar de forma precisa las repercusiones de las variaciones de la calidad seminal sobre los resultados de fertilidad obtenidos mediante la aplicación de dichas dosis, ha supuesto siempre un gran reto para los investigadores dedicados al estudio de la inseminación artificial ovina (**Graham et al., 1984; Uwland, 1984; Hafez, 1989**).

En el presente trabajo hemos encontrado diferencias significativas entre los distintos machos utilizados en las pruebas "in vitro" en relación a los diferentes

parámetros medidos (FMP, FMR, E+, NAR y FMP60) a las 0, 6 y 24 horas post-descongelación. Estas diferencias también se reflejan en la fertilidad "in vitro" (SPA) e "in vivo". Las fertilidades obtenidas tras la aplicación por vía cervical de las dosis congeladas de los cinco moruecos estudiados, nos permiten clasificar estos animales en tres grupos estadísticamente diferentes ($p < 0,01$):

- machos de fertilidad alta: (morueco A)
- machos de fertilidad media: (moruecos B y E)
- machos de fertilidad baja: (moruecos C y D)

A su vez esta clasificación se corresponde con la obtenida del SPA en la cual se establecen tres categorías de moruecos diferentes en función del porcentaje de penetración obtenido:

- PP > 70%: morueco A
- 40 < PP < 70%: moruecos B y E
- PP < 40%: moruecos C y D

En la **tabla 19** se observa que esta clasificación según el PP de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida ordena a los sementales en el mismo orden que cuando se clasifican en función de las fertilidades obtenidas tras la aplicación de sus dosis congeladas. Las tasas de fecundación "in vitro" obtenidas van a ser claros indicadores de las tasas de fecundación "in vivo".

Los resultados procedentes del análisis de discriminancia indican que el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados obtenido a las 0 h. post-descongelación va a ser el parámetro que mejor predice el poder fecundante "in vitro" del semen congelado de morueco, ya que este parámetro va a clasificar correctamente en los tres grupos anteriormente citados, el 84% de los casos estudiados. Son igualmente eficaces, para este mismo propósito el porcentaje de vivos con acrosoma y el porcentaje de E+ tras la descongelación, mientras que el poder predictor de la motilidad va a ser muy bajo, clasificando correctamente, tan sólo el 28% de los casos analizados.

El porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma (verdadera R.A.) a las 0 h. post-descongelación va a influir decisivamente sobre las tasas de fertilidad, ya que si este valor es muy elevado en este momento la viabilidad de las dosis va a disminuir rápidamente y por tanto, las tasas de fertilidad "in vitro" posteriores van

a ser muy bajas, por ello existe una relación tan directa entre el porcentaje de penetración de ovocitos de hámster y las tasa de R.A.

Los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y la endósmosis positiva clasifican correctamente el 80% de los casos analizados. Estos dos parámetros nos van a indicar respectivamente la integridad morfológica y funcional de la membrana plasmática. Estos aspectos resultan fundamentales para que el espermatozoide sufra la capacitación y reacción acrosómica, y se fusione con la membrana del ovocito, de aquí, su validez como método para determinar la calidad de una dosis seminal.

El porcentaje de motilidad a las 0 h. post-descongelación únicamente clasifica correctamente el 28% de los casos analizados, siendo por tanto, este parámetro un mal indicador del poder fecundante "in vitro" de una dosis seminal. Este hecho puede explicarse en parte por la naturaleza subjetiva de la valoración visual de dicho parámetro (Graham et al., 1984). No obstante, cuando se determina el porcentaje de motilidad tras la incubación de la muestra a 39°C durante 1 hora (FMP60), este parámetro va a tener un poder de predicción muy superior al de la motilidad nada más descongelar, clasificando correctamente el 60% de los casos estudiados. Nuestros resultados indican que la estimación subjetiva, cuando se determina después de un periodo de incubación de 1 h. a 39°C puede ser un buen indicador de la fertilidad.

Al igual que ocurre con la motilidad, cuando empleamos la microscopía de contraste de fases para estimar el estado del acrosoma como medidas del poder fecundante del semen, el porcentaje de casos mal clasificados es elevado. En este sentido, hemos comprobado (Garde et al., 1992) que un porcentaje variable de espermatozoides con borde apical normal en su acrosoma pueden no ser viables y por lo tanto, ser afuncionales, de aquí que el poder de predicción de este parámetro seminal no sea tan elevado como algunos autores han pensado (Saacke y Marshall, 1968).

Con respecto a las correlaciones estudiadas entre los parámetros analizados, puede verse (TABLAS 21, 22 y 23) una fuerte dependencia entre las variables que indican el estado funcional y morfológico de la membrana plasmática y el porcentaje de penetración de ovocitos de hámster. Existe una fuerte asociación entre el porcentaje de endósmosis positiva a las 0 horas y el porcentaje de penetración ($r=0,86$, $p<0,01$). Nuestros resultados coinciden con los reflejados por Jeyendran et al. (1984) en espermatozoides humanos, los cuales reflejan una alta correlación entre

el porcentaje de endósmosis positiva y el porcentaje de penetración ($r= 0,90$), por tanto, coincidimos con estos autores en que el SPA y la prueba de endósmosis positiva parecen evaluar los mismos aspectos funcionales de la célula espermática, por tanto la prueba de endósmosis puede ser usada como una alternativa al SPA para evaluar el poder fecundante "in vitro" del semen congelado de morueco.

Por el contrario, las correlaciones encontradas entre el porcentaje de penetración y la motilidad, calidad de movimiento y estado del acrosoma (NAR), no han sido tan elevadas, presentando un mejor grado de aproximación entre el PP y FMP60, sobre todo a las 24 h. post-descongelación ($r= 0,81$). Por ello, la prueba de endósmosis es el mejor parámetro de todos los analizados para evaluar la habilidad de los espermatozoides para experimentar la capacitación y reacción acrosómica y fusionarse posteriormente con la membrana que recubre al ovocito. Además, al ser esta prueba mucho más sencilla de realizar que el SPA, debería incluirse en todos los análisis realizados para evaluar la calidad del semen congelado de morueco. La prueba de endósmosis nos está indicando la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide, así como su capacidad para sufrir los cambios que acontecen durante la reacción acrosómica y la fertilización.

Finalmente, si bien los valores de integridad acrosómica son aceptables, esta medida no presenta una buena correlación con el SPA, mientras que el FMP60 va a presentar unos coeficientes de correlación elevados con el PP, sobre todos a las 6 y 24 h. post-descongelación ($r= 0,75$; $r= 0,81$). Ello nos indica que la termorresistencia también va a ser un buen indicador del poder fecundante de una dosis seminal. El método de evaluación del acrosoma por contraste de fases no es del todo correcto, ya que engloba espermatozoides muertos que a pesar de tener el acrosoma intacto no van a ser fértiles.

Resumiendo, la prueba de endósmosis celular utilizada para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática parece aportar unos resultados fiables y altamente correlacionados con el SPA ($r= 0,86$, $p< 0,01$), por ello esta prueba debería emplearse en el análisis rutinario del semen de morueco congelado.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1. Los procesos de congelación-descongelación van a alterar *per se* las características biológicas de los espermatozoides de morueco, originando un estado de capacitación prematuro y sincrónico, como queda reflejado por una técnica de triple tinción y por el test de penetración espermática.

2. Los procesos de capacitación y reacción acrosómica "in vitro" se presentan más rápidamente cuando las células espermáticas se preincuban a +39°C, siendo este efecto más evidente cuando los espermatozoides proceden de dosis congeladas.

3. La presentación de este estado prematuro de capacitación en el semen de morueco congelado, va a estar influenciada por la variabilidad individual, repercutiendo este hecho directamente sobre las tasas de fertilidad obtenidas al aplicar dichas dosis "in vitro" e "in vivo".

4. El test de penetración espermática clasifica a los sementales analizados en el mismo orden que los resultados de fertilidad obtenidos al aplicar sus dosis "in vivo".

5. El porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados a las 0 h. post-descongelación va a ser el parámetro, de todos los estudiados, que con mayor exactitud predice el poder fecundante "in vitro" de una dosis seminal.

6. Existe una alta correlación ($r= 0,86$, $p< 0,01$) entre el porcentaje de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida y la prueba de endósmosis, por tanto esta técnica debería emplearse para sustituir a aquella en el análisis rutinario del semen de morueco congelado.

7. RESUMEN

7. RESUMEN.

El presente trabajo ha tenido como objetivos estudiar en qué medida los procesos de congelación-descongelación modifican las características biológicas de las células espermáticas de morueco descongeladas, analizando además, la respuesta individual de diferentes machos a los procesos de congelación, sobre la presentación de la reacción acrosómica "in vitro" y los efectos de dicha variabilidad individual sobre la fertilidad "in vitro" e "in vivo"; y por último, determinar mediante distintas pruebas laboratoriales el porcentaje de espermatozoides perfectamente viables en una dosis seminal, entendiéndose por tal aquellos capaces de sufrir capacitación, reacción acrosómica y fusionarse con el ooplasma del ovocito.

La evaluación de los cambios presentados por los espermatozoides de morueco en el sistema de preincubación "in vitro" elegido, se realizó mediante el empleo de una técnica de triple tinción y de un sistema de fecundación "in vitro" heterólogo.

Los parámetros laboratoriales empleados para determinar "in vitro" el poder fecundante del semen de morueco congelado fueron: motilidad individual, calidad de movimiento, acrosomas normales, endósmosis positiva, termorresistencia y prueba de penetración espermática.

Nuestros resultados reflejaron diferencias significativas ($p < 0,001$) en todos los parámetros seminales analizados para el estudio de los efectos de la congelación sobre la fisiología espermática. Estas diferencias se traducen en la presentación de un estado de capacitación prematuro y sincrónico en las células espermáticas descongeladas con respecto a las refrigeradas (31% de V.R. *versus* 2,9% de V.R.), ello conlleva a una disminución más rápida de la viabilidad celular y a un acortamiento de las posibilidades de fertilización a medida que aumenta el periodo de incubación espermática. Acentuándose este estado cuando las muestras se preincubaban a $+39^{\circ}\text{C}$.

La aparición de este estado prematuro de reacción acrosómica en el semen de morueco congelado va a estar influenciada por el factor individual ($p < 0,001$), repercutiendo este hecho directamente sobre las tasas de fertilidad obtenidas "in vitro" e "in vivo", existiendo, por tanto, una alta correlación negativa ($r: -0,81$ $p < 0,01$) entre el porcentaje inicial de reacción acrosómica y el porcentaje de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida.

En relación a las pruebas laboratoriales empleadas para determinar el porcentaje de espermatozoides completamente viables, se obtuvieron resultados que indican que el porcentaje de V.R. va a ser la medida que con mayor exactitud establezca el poder fecundante "in vitro" de una dosis seminal (Wilk's Lambda = 0,08 $p < 0,001$). También se determinó que el porcentaje de endósmosis positiva es el parámetro que más se aproxima al PP ($r: 0,86$ $p < 0,001$), pudiendo, por tanto, sustituirla en el análisis rutinario del semen congelado de morueco.

8. *ABREVIATURAS*

8. ABREVIATURAS.

Albúmina sérica bovina.	BSA
Endósmosis positiva. .	E+
Espermatozoides vivos con acrosoma.	VA
Espermatozoides vivos sin acrosoma.	VR
Espermatozoides muertos con acrosoma.	MA
Espermatozoides muertos sin acrosoma.	MR
Espermatozoides con borde apical normal.	NAR
Fertilización "in vitro".	FIV
Gonadotropina coriónica humana.	HCG
Gonadotropina sérica de yegua gestante.	PMSG
Índice de penetración de ovocitos de hámster.	IP
Inseminación artificial.	IA
Inseminación artificial ovina.	IAO
Motilidad masal. .	MM
Motilidad individual. .	MI
Porcentaje de acrosomas intactos.	PIA
Porcentaje de motilidad postdescongelación.	FMP
Porcentaje de penetración de ovocitos de hámster.	PP
Prueba de penetración espermática.	SPA
Reacción acrosómica. .	RA
Solución de Dulbecco tampón fosfato modificada.	PBSDm
Solución de Biggers, Whitten y Whittingham.	BWW
Técnica de triple tinción.	TST

9. BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

AALSETH, E. and SAACKE, R. (1986). Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. Gamete Res., 15: 73-81.

ABDELHAKEM, A. (1988). Studies on freezing ram semen in absence of glycerol. Thesis. Minnesota.

AHUJA, K.K. (1985). Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. Am. J. Anat., 174: 207-223.

ALLISON, A. and ROBINSON, T. (1970). The effect of dose level of intravaginal progestagen on sperm transport, fertilization and lambing in the cyclic Merino ewe. J. Reprod. Fertil., 22: 515-531.

AMANN, R.D. (1988). Relationships between computerized evaluation of spermatozoa motion and competitive fertility index. Proceedings of the 12th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, pg. 38-44.

ANEL, E. (1990). Inducción experimental de la nucleación en la congelación del semen de morueco: Efectos sobre motilidad, endósmosis celular e integridad acrosómica. Tesina. Universidad de León.

ANEL, L., BOIXO, J., ANEL, E., CARBAJO, M., DOMINGUEZ, J., OLMEDO, J., ALVAREZ, M., CHAMORRO, C. y PAZ, P. (1992). Inseminación intrauterina (laparoscopia) en ovejas: resultados preliminares de su aplicación en condiciones de campo. VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e I.A. Salamanca. pg. 354-359.

ARMSTRONG, D.T. and EVANS, G. (1984). Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. J. Reprod. Fertil., 71:89-94.

AUSTIN, C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res., 4: 581-596.

BAMBA, K. (1988). Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. Theriogenology, 29 : 1245-1251.

BANK, H.L. and BROCKBANK, G.M. (1987). Basic principles of cryobiology. J. Cardiac. Surg. (suppl.) 2: 137-143.

BARROS, C., BEDFORD, J.M., FRANKLIN, L.E., y AUSTIN, C.R. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. J. Cell Biol. 34: C1-C4.

BEARED, E.L. Y FRIEND, D.S. (1982). Modifications of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. J. Cell Biol., 92: 604-615.

BEDFORD, J.M. (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol. Reprod. (Suppl.), 2: 128-158.

BEDFORD, J.M. (1983). Functional significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. Biol. Reprod., 31: 143-154.

BELTRAN DE HEREDIA, I., ARRESE, F., UARTE, E., LOPEZ DE MUNAIN, J.M., GABIÑA, D., UGARTE, C. (1989). La inseminación artificial con semen congelado en la raza Latxa: Resultados preliminares. III Jornadas sobre producción animal. ITEA 9: 250-252.

BERG, D., HUNTER, A., SINGH, G. and GRAHAM, E. (1990). Frozen ram semen immediately post-thaw, can fertilize sheep oocytes. J. Anim. Sci., 68 suppl. (1): 459.

BERGER, T. and PARKER, K. (1989). Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. Gamete Res., 22: 385-397.

BERGER, T. (1990). Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. Theriogenology, 33 (3): 689-695.

BIGGERS, J., WHITTEN, W and WHITTINGHAM, D. (1971). The culture of mouse embryos "in vitro". In: Methods in Mammalian embryology. Ed. Freeman and Co. San Francisco. pp: 86-116.

BIOTTNER, S., NEHRING, H. and TORNER, H. (1990). Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin "in vitro": Relationship to fertility. Theriogenology, 34: 610-626.

BLACKSHAW, A.W. (1954). The prevention of temperature shock of bull and ram semen. Aust. J. Biol. Sci., 7: 573-582.

BONDIOLI, K.R. and WRIGHT, R.. (1983). In vitro fertilization of ovulated and ovarian ovine oocytes. J. Anim. Sci. 57: 1006-1012.

BORQUE, M., VAZQUEZ I., SIMARRO, M. (1989). Determinación espectrofotométrica de fructosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de pequeños rumiantes. Forum internacional sobre Reproducción Animal. Bilbao. pg. 141-146.

BOWER, R.E., CRABO, B.G., PACE, M.M. and GRAHAM, E.F. (1973). Effects of dilution and glycerol on the release of glutamic-oxalacetic-transaminase (GOT) from boar spermatozoa. J. Anim. Sci., 36 (2): 319-324.

BOUSQUET, D. and BRACKETT, B. (1982). Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing of bull sperm after frozen storage. Theriogenology, 17: 199-212.

BRACKETT, P., BOUSQUET, D., BOICE, M., DONAWICH, W., EVANS, J. and DRESSEL, M. (1982). Normal Development following in vitro fertilization in the cow. Biol. Reprod., 27: 147-158.

CAMERON, A.W.N.; FAIRNIE, I.J.; CURNOW, D.M. and LINDSAY, D.R. (1984). The effect of frequency of semen collection and testicular size on the output of spermatozoa by rams. 10th I.C.A.R., pg. 267-269.

CARBONERO, D. (1951). Una modificación a la vagina artificial de bovinos y ovinos. II Congreso Internacional veterinario de Zootechnia. Madrid.

CARBONERO, D. Y VAZQUEZ, I. (1984). Congelación del semen de morueco. Conservación del acrosoma. Zootechnia, XXV: 30-42.

CASARETT, G. (1953). A one-solution stain for spermatozoa. Stain Technol., 28: 125-127.

CASSOU, R. (1964). La méthode des pailletes en plastique adaptée à la généralisation de la congélation. 5th I.C.A.R., Trento 4:540-546.

CLARKE, R. and JOHNSON, L. (1987). Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova in vitro. Gamete Res., 16: 193-204.

COGNIE, Y. and PELLETIER, J. (1976). Preovulatory LH release and ovulation in dry and in lactating ewes after progestagen and PMSG treatment during the seasonal anoestrus. Ann. Biol. Bioch. Biophys., 16: 529-536.

COLAS, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. J. Reprod. Fertil., 42:277-285.

- COLAS, C. (1979). Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influence on the photoperiod on the semen quality of the ram. Livestock Production Science, 6: 153-166.
- COLAS, G. (1980). Variations Saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile de France. I etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. Reprod. Nutric. Dévelop., 20 (6). 1789-1799.
- COLAS, G., TRYER, M., GUERIN, G. and AGNER, D. (1980). Survival and fertilizing ability of ram sperm stored in a liquid state during 24 hours. 9th I.C.A.R. Madrid, 3:315.
- COLAS, G. (1981). Variations Saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile de France. II. Fécondance: relation avec les critères qualitatifs observés in vitro. Reprod. Nutric. Dévelop. 21 (3). 399-407.
- COLAS, G. (1984). Semen Technology in the ram. The male in farm Animal Reproduction. pp. 219-236. Ed. M. Courot.
- COLAS, G., GUERIN, Y., CLANET, V. y SOLARI A. (1985). Influence de la durée d'eclaircissement sur la production et la fecondance des spermatozoïdes chez le bélier adulte Ile de France. Reprod. Nutr. Dévelop., 25 (1 A), 101-111.
- COLE, H.H. and CUPPS, P.T. (1984). Reproducción de los Animales Domésticos. Ed. Acribia. Zaragoza. 551 pp.
- CORNETT, L.E., BAVISTER, B. and MEIZEL, S. (1979). Adrenergic stimulation of fertilizing ability in hamster spermatozoa. Biol. Reprod., 20: 925-929.
- COY, P. (1991). Fecundación "in vitro" en la especie porcina: influencia de diferentes condiciones de cocultivo. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia
- CRITSER, E., ALMERON, B., AAKER, D., HUSE-BENDA, A. and BALL, G. (1987). Cryopreservation of human spermatozoa II. postthaw cronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. Fertil. Steril, Vol. 47, 6: 980-984.
- CROSS, N., and MEIZEL, S. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol. Reprod, 41: 635-641.
- CROZET, N. Y DUMONT, M. (1984). The site of the acrosome reaction during in vivo penetration of the sheep oocyte. Gamete Res., 10: 97-105.

CUMMINS, I., BROWN, J., BLOCKEY M., WINFIELD, G., BAXTER, R. and GODING, J. (1971). Constancy of interval between LH release and ovulation in the ewe. J. Reprod. Fertil., 24: 134-135.

CUMMINS, J.M. y YANAGIMACHI, R. (1986). Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated "in vitro", in relation to the timing of the acrosome reaction. Gamete Res., 15: 187-212.

CHANG, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes. Nature, 168: 997-998.

CHANG, M.C. (1957). Some aspects of mammalian fertilization. En: The beginning of Embryonic Development. Eds. A. Tyler, B.C. Van Bostel y C.B. Metz.. Washington, D.C. pp. 109-134.

CHANG, M.C. (1959). Fertilization of rabbit ova "in vitro". Nature, 84: 466-467.

CHANG, M. (1984). The meaning of sperm capacitation. J. Androl., 5: 45-50.

CHANG, M.C.; WALTON, A. (1940). The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. Proceedings of the Royal Society. ser B. 129: 517-527.

CHENG, W., MOOR, R.M. and POLGE, C. (1986). In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. Theriogenology Vol. 25 n° 1: 146.

CHERR, G., LAMBERT, H., MEIZEL, S., and KATZ, D. (1986). "In vitro" studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. (1986). Develop. Biol., 114: 119-131.

DACHEUX, J., PISSELET, G., BLANC, M., HOCHEREAM DE REVIERS, M. and COUROT, M. (1984). Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. J. Reprod. Fertil., 61: 363-371.

DAVIS, B., BYRNE, R. and HUNGUND, B. (1979). Studies on the mechanism of capacitation: evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation "in vitro". Bioch. Biophys. Acta, 588: 257,266.

DAVIS, B. (1980). Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. Arch. Androl., 5: 249-254.

DAVIS, I, KERTON, D., McPHEE, S., WHITE, M., BANFIELD, L. CAHILL, J. and GRANT, I. (1984). Uterine Artificial Insemination in ewes. In: Lindsay, D.R. and pearce, D.T. (Eds.) Reproduction in sheep. Cambridge University press.

DARIN-BENNET, A. and WHITE, I. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. Criobiology, 14: 466-470.

DIDION, B.A. and GRAVES, C.N. (1986). In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. J. Anim. Sci., 62: 1.029-1.033.

DODSON, M., MINHAS, B., CURTIS, S. PALMER, T. and ROBERSTON, J. (1989). Spontaneous zona reaction in the mouse as a limiting factor for the time in which an oocyte may be fertilized. J. in vitro Fert. Embryo Transfer, 6(2): 101-106.

DODDS, J. and SEIDEL, G. (1984). Effects of caffeine, Ca, capacitation time, and strain on "in vitro" fertilization in mice. Gamete Res., 10: 353-360.

DREVIUS, L. and ERIKSSON, H. (1966). Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. Expl. Cell Res., 42: 136-156.

Du MESNIL Du BUISSON, F. and DAUZIER, L. (1955). La remontée des spermatozoïdes du verrat dans le tractus de la truie en oestrus. C.R. Seances. Sco. Biol. Fil., 149: 76-79.

DUDENHAUSEN, E. and TALBOT, P. (1982). Detection and kinetics of the normal acrosome reaction of mouse sperm. Gamete Res., 6: 257-265.

DURAN DEL CAMPO, A. (1980). Anatomía fisiológica de la Reproducción e Inseminación Artificial en ovinos. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo. 264 pp.

DZIUK, P., LEWIS, J., GRAHAM, E. and MOYER, R. (1972). Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen sperm at an appointed time in the ewe. J. Anim. Sci., 35 (3): 572-575.

EVANS, G. and MAXWELL, W.M.C. (1989). Manejo y valoración del semen. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia, pg. 95-107.

FIRST, N.L. and PARRISH, J.J. (1987). In vitro fertilization of ruminants. J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 34: 151-165.

FISER, P.S., AINSWORTH, L. and LANGFORD, G.A. (1981). Effect of osmolarity of skim milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. Cryobiology, 18:399-403.

FISER, P.S., AINSWORTH, L. and FAIRFULL, R.W. (1982). Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluents. Can. J. Animal Sci., 62:425-428.

FISER, P.S. and FAIRFULL, R.W. (1984). The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. Cryobiology, 21:542-551.

FISER, P.S. and FAIRFULL, R.W. (1986). The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on survival of spermatozoa before and after freezing. Cryobiology, 23:518-524.

FISER, P.S., FAIRFULL, R.W. and MARCUS, G.J. (1986). The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. Cryobiology, 23: 141-149.

FISER, P., AINSWORTH and FAIRFULL, R. (1987). Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. Theriogenology, 28: 599-607.

FISER, P.S. and FAIRFULL, R.W. (1989). The effect of glycerol related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of spermatozoa. Cryobiology, 26:64-69.

FISER, P.S. (1989). Cryobiology of gametes. Forum Internacional sobre Reproducción Animal. Bilbao. pg. 27-38.

FISER, P.S. and MARCUS, G.J. (1989). Continuous live-dead discrimination of ram sperm during freezing. Gamete Res., 22:301-305.

FLECHON, J., HARRISON, R., FLECHON, B. and ESCAIG, J. (1986). Membrane fusion events in the Ca²⁺ ionophore-induced Acrosome Reaction of ram spermatozoa. J. Cell Sci., 81: 43-63.

FLEMING, A. and YANAGIMACHI, R. (1981). Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. Gamete Res., 4: 253-273.

FLEMING, A. and KUEHL, T. (1985). Effects of temperature upon capacitation of guinea pig spermatozoa. J. Exp. Zool., 233: 405-411.

FOLCH, J. (1987). La inseminación artificial ovina en España: estado actual y perspectivas. V Jornadas Técnicas sobre ganado ovino. Expoaviga, 87: 7-14.

FOLCH, J. (1990). Utilización práctica del "efecto macho" para la provocación de celos y ovulaciones en ganado ovino. ITEA, 86A.(3): 145-163.

FOOTE, R.H. (1988). Preservation and fertility prediction of spermatozoa. 11th. I.C.A.R., Dublín 5: 126-134.

FUKUI, Y.; FUKUSHIMA, M. and ONO, H. (1988). Fertilization in vitro of bovine oocytes after various sperm procedures. Theriogenology, 20: 651-660.

GABIÑA, D y FOLCH, J. (1987). La inseminación artificial ovina, resultados de su aplicación en un programa de selección en la raza Rasa aragonesa. ITEA, 68: 15-25.

GARCIA ARTIGA, C. (1992). Viabilidad del semen congelado de morueco. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

GARCIA MATAMOROS, E.A. (1980). Lesión criogénica de membranas celulares y su crioprotección. Academia de Ciencias Veterinarias de Madrid. pg. 1-46.

GARDE, J., G^a ARTIGA, C., GUTIERREZ, A. y VAZQUEZ, I. (1992). Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. Med. Vet., 9: 107-114.

GO, K and WOLF, D. (1985). Albumin-mediated changes in the sperm sterol contents during capacitation. Biol. Reprod., 32: 145-153.

GOMES, W.R. (1984). Inseminación Artificial. En: Reproducción de los animales domésticos. Cole y Cupps. Ed. Acribia. pg. 215-235.

GRAHAM, E., VAZQUEZ, I. and SCHMEHL, M. (1977). Prueba de la calidad del semen mediante el uso del filtro de sephadex. Rev. INIA, 8: 11-15.

GRAHAM, E.F., CRABO, B.G. and PACE M.M. (1978). Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. XII Biennial Symposium on Animal Reproduction. 47 suppl. (2): 800-118.

GRAHAM, E.F. (1978). The integrity of frozen spermatozoa. National Academy of Sciences. 1-44.

GRAHAM, E., SCHMEHL, M. and NELSON, D. (1980). Problems with laboratory assays. Proc. 8th NAAB Tech. Conf. A.I. Reprod.: 59-66.

GRAHAM, J., NOLAN, J. and HAMMERSTEDT, R. (1991). Effect of dilauroyl-phosphatidylcholine liposomes on motility, induction of the acrosome reaction, and subsequent egg penetration of ram epididymal sperm. Biol. Reprod., 44: 1092-1099.

GRAHAM, E.F., SCHMEHL, M.L. and DEYO, R.C.M. (1984). Cryopreservation and Fertility of fish, poultry and mammalian spermatozoa. 10th Tech. Conf. A.I., pg. 1-29.

GRAHAM, J. and FOOTE, R. (1987). Dilaurolyphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and "in vitro" penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm. A fertility assay for frozen-thawed semen. Gamete Res., 16: 147-158.

GUSTAFSSON, B. (1978). Aspects of fertility with froze-thawed ram semen. Criobiology, 15: 358-361.

HAFEZ, E. (1989). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Nueva Editorial Interamericana. México. 694 pp.

HARRISON, R. and ROLDAN, E. (1990). Phosphoinositides and their products in the mammalian sperm acrosome reaction. J. Reprod. Fertil., (suppl.) 29: 51-67.

HAWK, H. and CONLEY, H. (1975). Involvement of the cervix in sperm transport failures in the reproductive tract of the ewe. Biol. Reprod., 13: 322-328.

HAWK, H., COOPER, B. and CONLEY, H. (1987). Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. Theriogenology, 28: 139-153.

HEALEY, P. (1969). Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. J. Reprod. Fertil., 18: 21-27

HOLT, W., HEAD, M. and NORTH, R. (1992). Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: onservations with experimental cryomicroscopy. Biol. Reprod., 4: 1086-1094.

HOWARD, T.H. and PACE, M.M. (1988). Seminal Evaluation and Artificial Insemination. Fertility and Infertility in veterinary practice, pg: 39-51. Bailliere Tindall. London. England.

HUNTER, R. and NICHOL, R. (1983). Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. J. Exp. Zool., 228: 121-128.

HUNTER, R. and WILMUT, I. (1984). Sperm transport in the cow: peri-ovulatory distribution of viable cells within the oviduct. Reprod. Nutr. Dévelop., 24: 597-608.

HUNTER, R. (1986). Sperm transport in farm animals. World. Rev. Anim. Prod., 22 (4): 85-89.

HUNTER, R. (1988). The fallopian tubes: Their role in fertility and infertility. Springer - Verlag, Berlin.

HUNTER, R.H.F. (1990). Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 40: 211-226.

HUNTER, R. (1991). Oviducts function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. Mol. Reprod. Develop., 29: 385-391.

HUNTON, J.R., FLECKER, S.E. and MAXWELL, W.M.C. (1987). Pregnancy rate following intrauterine insemination with pellet or straw-frozen ram semen. J. Agric. Sci. Camb. 109:189-191.

INSKEEP, E.K. (1974). Artificial Insemination and Preservation of ram semen. Artificial Insemination in sheep. Bulletin 629. pag. 5-28. Ed. West Virginia University. Agricultural Experiment Station.

IRITANI, A. and NIWA, K. (1977). Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fertil. 50: 119-121.

JABBOUR, H.N. and EVANS, G. (1991). Fertility of superovulated ewes following intrauterine of oviductal insemination with fresh or froze-thawed semen. Reprod. Fertil. Dev. 3: 1-7.

JEYENDRAN, R.S. and GRAHAM, E.F. (1980). A evaluation of crioprotective compomds on bovine spermatozoa. Cryobyology, 17:458-464.

JEYENDRAN, R., VAN DER VEN, H., PEREZ-PELAEZ, M., GRABO, B. and ZANAVELD, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship other semen characteristics. J. Reprod. Fertil. 70: 219-228.

JONES, R.C. (1969). Influence of diluents and processing times after ejaculation on the survival of deep-frozen ram spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 22: 995-1004.

- JONES, R. (1973). Changes occurring in the head of boar spermatozoa: vesiculation or vacuolation of the acrosome?. J. Reprod. Fertil., 33: 113-118.
- JONES, R.C. and MARTIN, I.C.A. (1973). The effects of dilution, egg-yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 35:311-320.
- KATZ, D.F. and OVERSTREET, J.W. (1981). Sperm motility assessment by videomicrography. Fertil. Steril., 35 (2): 188-193.
- KILLEN, I. and MOORE, N. (1970). Fertilization and survival of fertilized eggs in the ewe following surgical insemination at various times after the onset of oestrus. Aust. J. Biol. Sci., 23: 1279-1287.
- KILLEN, I. and CAFFREY, G. (1982). Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. Aust. Vet. J., 59:95.
- KINSEY, W., SEGALL, G. and LENNARZ, W. (1979). The effect of the acrosome reactions on the respiratory activity and fertilizing capacity of echinoid sperm. Dev. Biol., 71: 49-59.
- KUSUNOKI, H.; FUJISAKI, H.; KATO, S. and KANDA, S. (1987). Induction of the acrosome reaction in goat spermatozoa by their preincubation in the isolated hamster uterus. Mem. Grad. School Sci. and Technol. Kobe Univ. 5-A: 79-86.
- LAMBERT, H. (1981). Temperature dependence of capacitation in bat sperm monitored by zona-free hamster ova. Gamete Res., 4: 525-533.
- LANGFORD, G. and MARCUS, G. (1982). Influence of sperm number and seminal plasma on fertility of progestagen-treated sheep in confinement. J. Reprod. Fertil., 65: 325-329.
- LANGLAIS, J y ROBERTS, K.D. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Gamete Res., 12: 183-224.
- LANGLAIS, J., ZOLLINGER, M., PLANTE, L., CHAPDELAIN, A., BLEAU, G. y ROBERTS, K.D. (1981). Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa., 78: 7266-7270.
- LEIBO, S.P. (1981). Conservación de ovocitos y embriones mediante congelación. Avances en Zootecnia. Nuevas Técnicas de Reproducción Animal Ed. Acribia, pg. 143-157.

LENZ, R.; BALL, G.; LOMSE, J.; FIRST, N.C. and AX, R. (1983). Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy electron microscopy and in vitro fertilization. Biol. Reprod., 28: 683-690.

LIGHTFOOT, R.J. and SALAMON, S. (1969a). Freezing ram spermatozoa by the pellet method. The effects of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration and duration of storage at 5°C prior to freezing on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 22: 1547-1560.

LIGHTFOOT, R.J. and SALAMON, S. (1969b). Freezing ram spermatozoa by the pellet method. III The effect of pellet volume, composition of the thawing solution and reconcentration of the thawed semen on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 22: 1561-1572.

LIGHTFOOT, R.J. and SALAMON, S. (1970). Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. J. Reprod. Fertil., 22: 385-398.

LOPEZ SEBASTIAN, A. (1991). Descarga preovulatoria de LH y momento de la ovulación en ovejas con celo inducido mediante progestágenos y PMSG. Rev. INIA Vol. 6: 123-131.

LOPEZ SEBASTIAN, A. (1992). Inseminación artificial intrauterina con semen congelado en la oveja. ITEA, 88A N° 1: 70-75.

LOVELOCK, J. E. (1953). The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. Biochim. biophys. Acta, 10: 414-26.

LOVELOCK, J.E. and POLGE, C. (1954). The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol, Biochem. J., 58, 618-22.

LU, K. and GORDON, I. (1988). Effect of heparin on the capacitation of frozen-thawed bovine spermatozoa used in the in vitro fertilization (IVF) of oocytes matured in vitro. 11th I.C.A.R. Vol. III: 339. Dublin.

LUI, C. and MEIZEL, S. (1979). Further evidence in support of a role for master sperm hydrolytic enzymes in the acrosome reaction. J. Exp. Zool., 207: 173-186.

MAHI, C. and YANAGIMACHI, R. (1973). The effects of temperature, osmolarity and hydrogen concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 35: 55-66.

MAKLER, A. (1978). A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoa motility determination. Fertil. Steril., 30: 192-199.

MANN, T. (1964). The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Methuen, London.

MANN, T. and LUTWAK-MANN, C. (1981). Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Springer Verlag. Berlin.

MARINOV, P and DACHEVA, D. (1984). Individual variation of ram semen freezability and its correlation to K, Na and citric acid levels in seminal plasma. 10th I.C.A.R., Illionis, 3:385-388.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL A.R. (1979). Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. J. Reprod. Fertil. (suppl.), 27: 47-51.

MARTIN RILLO, S., ALIAS, C., YUBERO, C.D. and MARCOS, C.P. (1980). Freezing of boar semen. 9th I.C.A.R., Madrid, 5:431-434.

MARTINEZ, E., RUIZ, S., ROCA, J. y VAZQUEZ, J.M. (1989). Fecundación "in vitro" en los animales de granja. Eds. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia. Murcia.

MATTIOLI, M., BACCI, M.L., GALEATI y SEREN, E. (1991). Development competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. Theriogenology, 31 (6): 1201-1207.

MATTNER, P.E.; ENTWISTLE, K.W. and MARTIN, I.C.A. (1969). Passage survival and fertility of deep-frozen ram semen in the genital tract of the ewe. Aust. J. of Biol. Sci., 22: 181-187.

MAXWELL, W. (1986). Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus 1. Effects of the onset of oestrus ovulation and insemination of fertility. An. Reprod. Sci., 10: 301-308.

MAZUR, P. (1965). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular ice in frozen and thawed cells. F. Proc., 24 (suppl. 15): S175-82.

MAZUR, P. (1980). Aspectos fundamentales de la congelación de células especialmente óvulos y embriones de mamíferos. 9th I. C.A.R., Madrid, 2:99-114.

- MEIZEL, D. (1985).** Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. Am. J. Anat., 174: 285-302.
- MEMMON, M.A. and OTT, R.S. (1981).** Methods of semen preservation an Artificial Insemination in sheep and goats. Animal Production, 17 (1): 19-25.
- MERYMAN, H.T. (1971).** Cryoprotective agents. Cryobiology, 8:173-183.
- MICKENSEN, W.D., PAISLEY, L.G. and DAHMEN, J.J. (1981).** The effect of scrotal circumference, sperm motility and morphology in the ram on conception rates and lambing percentage in the ewe. Theriogenology, 16:53-57.
- MILOVANOV, V. (1934).** Artificial insemination of livestock. Seljhozgiz. Moscow.
- MOLE, J.R. and FITZGERALD, J.A. (1990).** Comparison of ram sperm interaction with bovine cervical mucus. Theriogenology, 33(5): 1031-1043.
- MOORE, H., HALL, G and HIBBITT, K. (1976).** Seminal plasma proteins and the reaction of spermatozoa from intact boars and from without seminal vesicles to cooling. J.Reprod. and Fertil., 47: 39-45.
- MOORE, S., SMITH, C., HARTMAN, T. and BYE, A. (1987).** Visualization and characterization of the acrosome reaction of human spermatozoa by immunolocalization with monoclonal antibody. Gamete Res., 17: 245-259.
- NAGASE, H. and NIWA, T. (1964).** Deep freezing of bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival of spermatozoa. In V.I.C.A.R., Trento. Vol 4, pp 410-15.
- NAGASE, H., YAMASHITA, S and IRIE, S. (1968).** Protective effects of sugars against freezing injury bull spermatozoa. 6th I.C.A.R., Paris 2:1111-1113.
- NATH, J. and PATT, J. (1970).** Biochemical changes associated with freezing in ram semen. An assay of semen quality by use of sephadex filtration. Cryobiology, 6(6): 522-528.
- OHGODA, O., NIWA, M., YUHARA, M., TAKAHASHI, S. and KANOYA, K. (1988).** Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after A.I. using frozen semen from different bulls. Theriogenology, 29: 1375-1381.
- OLIPHANT, G., REYNOLDS, A.B. Y THOMAS, T.S. (1985).** Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. Am. J. Anat., 174: 269-283.

OLMEDO, J. Y MERINO, E. (1988). Una nota sobre los resultados preliminares de inseminación artificial de ganado ovino de raza Churra. ITEA, 74: 40-45.

OLMEDO, J. (1989). Resultados de inseminación artificial en ganado ovino de raza Churra. 4ª Jornadas Intern. de Reprod. Anim. e I.A.. Ponencias (León): 481-494.

PARRISH, J.; SUSKO, J. and FIRST, N.C. (1985). Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. Theriogenology, Vol. 24 n° 5: 537-549.

PATT, J.A. and NATH, J. (1969). Effects of diluents, equilibration time and freezing rates on the storage of ram semen. Cryobiology, 5 (6): 385-392.

PAULOK, A. (1981). Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated "in vitro". Int. J. Fertil., 26: 101-106.

PEREZ GARCIA, T. (1958). Importancia de la Tecnología correcta en la obtención del semen bovino. Rev. Patron. biol. Anim., Vol. IV, 3: 249-257.

PEREZ GARCIA, T., CALDERON F., CUELLAR L., VIGIL, E., ORDEN, M.A. y PEREZ, F. (1987). Parámetros Reproductivos y Correlación con la fertilidad en el morueco de raza manchega. Zootechnia, Vol. XXXVI. N° 1. pg. 20-44.

PEREZ GARCIA, T. (1989). Nuevos avances en el control del ciclo estral en la oveja. 4ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, I.A. Ponencias (León): 443-468.

PEREZ Y PEREZ, F. (1985). Reproducción animal, inseminación artificial y transplante de embriones. Ed. Científico Médica. Madrid.

PHILLIPS, P.H. (1939). Preservation on bull semen. J. Biol. Chem., 130:415.

PICKETT, B., McDONALD, W., GOSSLEE, D. and COWAN, V. (1961). Correlation between certain laboratory stress tests and fertility of frozen bovine spermatozoa. J. of Dairy Sci., 44: 1134-1140.

POLGE, C. (1957). Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. Proc. R. Soc. B., 147: 498-508.

POLGE, C., SMITH A.U. and PARKES, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, London 164:666.

PONTBRIAND, D., HOWARD, J.G., SCHIEWE, M.C., STUART, L.D. and WILDT, D.E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology, 26:341-354.

PURSEL, V.G. and JOHNSON, L.A. (1972). Loss of boar sperm fertilizing capacity associated with altered acrosome morphology during "in vitro" storage. VII I.C.A.R., Munich 2: 1525-1600.

PURSEL, V., JOHNSON, L. and SCHULLMAN, L. (1973). Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. of Animal Sci., 37: 528-531.

PURSEL, V. and JOHNSON, L. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. Theriogenology, 1 (2): 63-68.

QUINLIVAN, T. and ROBINSON, T. (1967). The number of spermatozoa in the fallopian tubes of ewes at intervals after artificial insemination following withdrawal of Sc-9880 impregnated intravaginal sponges. In: The Control of the Ovarian Cycle in the Sheep. Ed. by T.J. Robinson. Sydney Univ. Press.: 177-184.

QUINN, P., SALAMON, S. and WHITE, I. (1968). The effects of cold shock and deep-freezing of ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by an artificial vagina. Aust. J. of Agric. Res., 19: 119-128.

QUINN, P.J., CHOW, P.Y. and WHITE, I.G. (1969). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. J. Reprod. Fertil., 60:403-407.

ROBBINS, R.K., SAACKE, R.G. and CHANDLER, P.T. (1976). Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws. J. Anim. Sci., 42 (1): 145-154.

ROBERTSON, L. and WATSON, P.F. (1986). Calcium movements in diluted and cooled ram semen. J. Reprod. Fert., 77:177-185.

ROBINSON, T. (1967). The control of the ovarian cycle in the sheep. Ed. T. J. Robinson. Sydney Univ. Press.

ROLDAN, E. and HARRISON, R. (1989). Molecular mechanism leading to exocytosis during the sperm acrosome reaction. In: Fertilization in mammals. Ed. Bavister. 1-13. New York.

SAACKE, R.G. and MARSHALL, C.E. (1968). Observation on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 16:511-514.

SAACKE, R.G. (1983). Semen quality in relation to semen preservation. J. Dairy Sci. 66:2635-2644.

SALAMON, S. (1962). Studies on the artificial insemination of Merino sheep. III. The effect of frequent ejaculation on semen characteristics and fertilizing capacity. Aust. J. agric. Res., 13, 1137-50.

SALAMON, S. (1967). Deep-freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. Aust. J. Biol. Sci., 21, 351-60.

SALAMON, S and VISSER, D. (1972). Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Australian J. Biol. Sci., 25:605.

SALAMON, S and VISSER, D. (1974). Fertility of ram spermatozoa frozen-stored for 5 years. J. Reprod. Fertil., 37:433.

SALING, P. and BEDFORD, J. (1981). Absence of species specificity for mammalian sperm capacitation in vivo. J. Reprod. Fertil., 63: 119-123.

SCHELLANDER, K., BRACKETT, B., KEEFER, C. and FAYRER-HOSKEN, R. (1989). Testing capacitation of bull sperm with zona-free hamster ova. Anim. Reprod. Sci., 18: 95-104.

SCHMEHL, M.K., VAZQUEZ, I. and GRAHAM, E.F. (1986). The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to Test-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. Cryobiology, 23: 512-517.

SCHIEWE, M., HOWARD, J., GOODROWE, K., STUART, L. and WILDT, D. (1990). Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin $F_{2\alpha}$ synchronization is compromised by premature luteal regression. Theriogenology, 34: 469-486.

SLAVIK, T. (1987). Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. J. Reprod. Fertil., 79:99-103.

SMITH, T. and YANAGIMACHI, R. (1991). Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. J. Reprod. Fertil., 91: 567-573.

SPALLANZANI, L. (1776). Opuscoli di Fisica Animale e Vegetabile Opuscola. II. Observationi e sperienze intorno ai vermicelli spermatici dell' homo e degli animali. Modena.

STEPTOE, P. and EDWARDS, R. (1978). Birth after the reimplantation of an human embryo. Lancet., 12: 366.

SUAREZ, S. (1987). Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. Biol. Reprod., 36: 203-210.

SUTTIYOTIN, D. and THWAITER, C.J. (1991). The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa. Anim. Reprod. Sci., 25:209-224.

SYNNOTT, A., FULKERSON, W. and LINDSAY, D. (1981). Sperm output by rams and distribution amongst ewes under conditions of continual mating. J. Reprod. Fertil., 61: 355-361.

TALBOT, P. and CHACON, R.S. (1981). A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J. Exp. Zool., 215: 201-208.

TASSERON, F., AMIR, D. and SCHINDLER, H. (1977). Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution cooling and freezing. J. Reprod. Fertil., 55:461-462.

THOMAS, T.S., REYNOLDS, A.B. and OLIPHANT, G. (1984). Evaluation of the site of synthesis of rabbit sperm acrosome stabilizing factor using immunocytochemical and metabolic labeling techniques. Biol. Reprod., 30: 693-705.

THOMPSON, J. and CUMMINS, J. (1984). Problems of ovine "in vitro" fertilization. In: Reproduction in sheep. Lindsay, D.R. and pearce, D.T. (Eds.). Cambridge University Press. Cambridge: 310-312.

TREJO, G., SOTO, G., NERIA, V y PEÑA, V. (1984). Reunión de investigación pecuaria de México., 322-324.

UNAL, M.B. , BERNDTSON, W.E. and PICKETT, B.W. (1978). Influence of sugars with glycerol on post-thaw motility of bovine spermatozoa in straws. J. Dairy Sci., 61:83-89.

UWLAND, J. (1984). Possibilities and limitations of semen evaluation for prognosis of male fertility. The male in farm reproduction. pg. 269-325.

VALLET, J., CASSOU, B, DESPIERRES, E and KOYMUJIEV. (1988). Practical method of improving the use of frozen semen by intra-uterine insemination under laparoscopic control. 11th I.C.A.R., Dublin, 3: 305.

VARNER, D., WARD, C., STOREY, B. and KENNEY, R. (1987). Induction and characterization of acrosome reaction in equine sperm. Am. J. Vet. Res., 48: 1383-1389.

VAZQUEZ, I. (1980). Nuevos métodos de valoración del semen en reproductores ovinos y porcinos. Tesis Doctoral. Universidad de León.

VAZQUEZ, I., MARTINEZ, F., ALCAIDE, M. y DIAZ YUBERO, C. (1986). Congelación del semen de morueco. XI Jornadas Científicas de la S.E.O.C. pg. 169-176. Palencia.

VAZQUEZ, I., GRAHAM, E.F., MARTINEZ, F., ALCAIDE, M., SORIANO, I. (1988). Fertility with frozen ram semen in Manchego sheep. 11th I.C.A.R., Dublín. 3:305.

VAZQUEZ, J.M. (1991). Fecundación in vitro en la especie porcina: Análisis de la capacitación y reacción acrosómica. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

VIJIL MAESO, E. (1986). La Inseminación Artificial ovina: una técnica a potenciar. ONE "Especial ovino", 2^a ed. pg: 61-68.

VIRUELA, M. and RAJANIEMI, H. (1983). Effect of seminal plasma and Ca on the stability of the surface protein composition of ejaculated bull spermatozoa. Andrologia, 15:436-445.

VISSER, D. and SALOMON, S. (1974). Fertility following inseminations with frozen-thawed reconcentrated and unconcentrated ram semen. Aust. J. Biol. Sci., 27:423-425.

VISSER, D. (1974). The effect of pellet volume, dilution rates prefreezing and at thawing and of thawing temperature of the survival and acrosome morphology of frozen ram spermatozoa. S. Afr. J. Anim. Sci., 4:147-155.

VOGLMAYR, J., CHARTIER, D. and SAWYER, R. (1983). Viability of ram testicular spermatozoa following cryopreservation in rete testis fluid. Cryobiology, 20: 421-431.

WALES, R.G. and WHITE, I.G. (1959). The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. J. Endocrin., 19: 211-220.

WASSARMAN, P.M. (1987). Early events in mammalian fertilization. Ann. Rev. Cell Biol., 3: 109-142.

WATSON, P.F. (1975a). Use of Giemsa stain to detect changes in the acrosomes of frozen ram spermatozoa. Vet. Rec., 97, 12-15.

WATSON, P.F. (1975b). The interactions of egg-yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. J. Reprod. Fertil., 42:105-111.

WATSON, P.F. (1979). The preservation of semen in mammals. In: Finn C A (ed) Oxford reviews of Reproductive Biology. Oxford University Press. Vol. 7 pp. 283-350.

WATSON, P.F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. J. Reprod. Fertil., 62:483-492.

WATSON, P.F. and MARTIN, I.C.A. (1972). A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 28:99-101.

WATSON, P.F. and MARTIN, I.C.A. (1975). Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 28:153-159.

WATSON, P.F. and DUNCAN, A.E. (1988). Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. Cryobiology, 25:131-142.

WATSON, P. (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. Marshall's Physiology of Reproduction. 2: Reproduction in the male. Edimburgo. pg. 747-869.

WATSON, P., JONES, P. and PLUMMER, J. (1991). A quantitative comparison of the spontaneous and ionophore-induced acrosome reaction in ejaculated ram spermatozoa: the effects of temperature, time and individual. An. Reprod. Sci., 24: 93-108.

WEINMAN, D.E. and WILLIAMS, W.L. (1964). Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. Nature, 203: 423-424.

WHEELER, M. and SEIDEL, G. (1986). Time Course of "in vitro" capacitation of frozen and unfrozen bovine spermatozoa. Theriogenology, 25: 216.

WHITE, I.G., BLACKSHAW, A.W. and EMMENS, C.W. (1954). Metabolic and motility studies relating to low temperature storage of ram and bull spermatozoa. Aust. Vet. J., 30: 85-94.

YANAGIMACHI, R. (1969). "In vitro" capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. J. Reprod. Fertil., 18: 275-286.

YANAGIMACHI, R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J. Reprod. Fertil., 23: 193-196.

YANAGIMACHI, R., YANAGIMACHI, H. and ROGERS., B. (1976). The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod., 15: 471-476.

YANAGIMACHI, R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. En: Fertilization and Embryonic Development in vitro. Plenum Press, New York. pp. 81-182.

YANAGIMACHI, R. (1988). Mammalian fertilization. en: The Physiology of Reproduction. Eds. E. Knobil y J. Neil et al. Raven Press. Ltd. New York. pp: 135-185.